

Humboldt-Universität zu Berlin



DISSERTATION

**Chemoresistenzassoziierte Veränderungen
der Proteinexpression bei Kolon-,
Mamma-, Magen-, Pankreaskarzinom und
Fibrosarkom mit Hilfe der
hochauflösenden zweidimensionalen
Elektrophorese im immobilisierten pH-
Gradienten**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie

der medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Köttgen

Gero Hütter

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter:

1. PD Dr. Dr. P. Sinha
2. Prof. Dr. D. Schadendorf
3. Prof. Dr. M. Dietel

eingereicht:

Datum der Promotion: 4.2.2000

1 Einleitung

1.1 Chemoresistenz bei der Behandlung maligner Neoplasien: Stand der Forschung

Bei der Behandlung disseminierter maligner Neoplasien ist die Chemotherapie mit Hilfe zytostatisch oder zytotoxisch wirksamer Substanzen oftmals die einzige Therapiestrategie mit Aussicht auf Erfolg. Seit dem erstmaligen Gebrauch von Nitrogen Mustard zur Behandlung bösartiger Tumore Mitte der vierziger Jahre (Rhoads 1946), konnten zahlreiche andere chemotherapeutische Wirkstoffe gefunden werden, die Einzug in die klinische Anwendung fanden. Therapielimitierend ist jedoch häufig die Manifestation einer Chemoresistenz, die nicht nur gegen Vertreter einer Stoffklasse gerichtet ist, sondern meist ein breites Spektrum strukturell unterschiedlicher Substanzen einschließt.

Die Ursachen für die Entwicklung einer Chemoresistenz können grundsätzlich auf allen zellulären Ebenen begründet liegen. Sie reichen von der Aufnahme durch die Zellmembran, über die intrazelluläre Modifikation bis zur verminderten Affinität zum Wirkungspunkt des therapeutischen Agens.

Zusammenfassend lassen sich die wichtigsten dieser Mechanismen aufteilen in:

1. Verminderte Aufnahme des Substrates in die Zelle
2. Vermehrte Inaktivierung oder verminderte Aktivierung des Substrates intrazellulär
3. Verminderte Affinität des Substrates zu den intrazellulären Zielen
4. Gesteigerte Reparationskapazität der Zelle

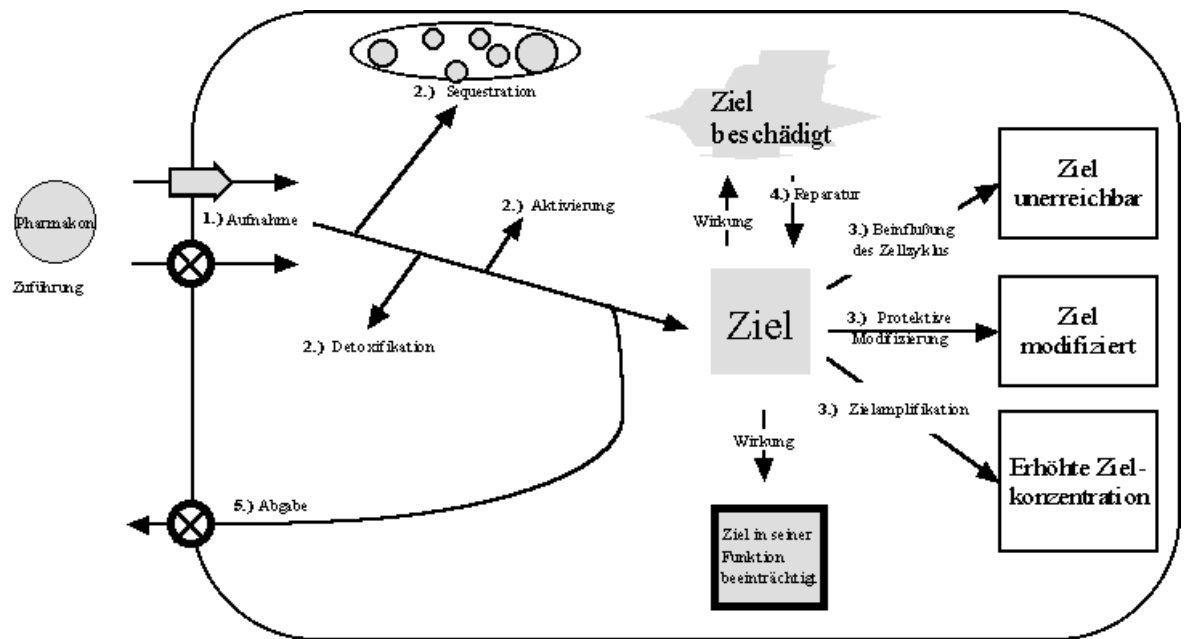


Abbildung 1.1.1

*Biochemische Grundmechanismen der Chemoresistenz (mod. n. Hayes 1990).
Erläuterungen der Punkte 1-5 siehe Kapitel 1.1.1 bis 1.1.5*

Die oben aufgeführten Möglichkeiten zur Ausbildung einer Chemoresistenz sind zum Teil substratspezifisch und stehen somit nicht alle im direkten Zusammenhang mit der klinisch bedeutsamen unspezifischen Vielfachresistenz gegen ein weites Feld von Therapeutika. Für diesen Fall lässt sich ein fünfter Punkt definieren, der die Wirkung energieabhängiger Transportproteine zur zellulären Detoxifikation beschreibt:

5. Geringere intrazelluläre Konzentration durch einen auswärtsgerichteten Substratstrom, der durch Transportproteine vermittelt wird

1.1.1 Verminderte Aufnahme des Substrates in die Zelle

Mutationen an den Genen der für das Eindringen der Chemotherapeutika notwendigen Transportproteine ist für Resistenzen verantwortlich, wie sie für

Methotrexat beschrieben worden sind. Methotrexat (MTX), ein 4-NH₂-N¹⁰-methyl Analog der Folsäure gelangt durch einen aktiven Transportprozeß, welcher physiologischer Weise für N5-Methyltetrahydrofolat und für N5-Formyltetrahydrofolat besteht, in die Zelle (Goldman 1978, Bender 1975, Schilisky 1981). Bei hoher MTX Konzentration ist noch ein zweiter, allerdings weniger effektiver Mechanismus zur intrazellulären Aufnahme des Pharmakons vorhanden (Hill 1979, Henderson 1984).

Eine Verminderung des Transportes kann entweder durch eine geringere Affinität an dem Rezeptor oder eine Senkung der Transportrate begründet sein. Studien an leukämischen Mäusen zeigten bei dem resistenten Phänotyp L1210 eine 3-5fache Reduktion des maximalen Substrateinstromes in die Zellen (Hill 1979, Sirotnak 1981, Bertino 1980). Den überlebensnotwendigen Bedarf, der durch die Transportminderung ebenfalls betroffene Folsäureaufnahme, erfolgt über zusätzliche Wege: Zum einen über einen Folsäurerezeptor mit geringer Affinität (Sirotnak 1987), zum anderen über ein Folsäure bindendes Protein mit hoher Affinität (Jansen 1989). Beide alternative Wege sind gegenüber einer Beeinträchtigung von MTX insensibel.

1.1.2 Vermehrte Inaktivierung oder verminderte Aktivierung des Substrates intrazellulär

Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der Detoxifikation durch Konjugation mit Glutathion zu. Glutathion wirkt als Sulfhydrylpuffer, indem es von einer reduzierenden Thiolform (GSH) in die oxydierende Form (GSSG) wechselt. GSSG wird anschließend von der Glutathion-Reduktase, einem Flavoprotein mit NADPH als Elektronendonator, zu GSH reduziert. Die Neusynthese von GSH erfolgt über zwei ATPabhängige Schritte: 1.) γ -Glutamylcystein-Synthetase katalysiert eine Amidbindung zwischen Cystein und dem γ -Carboxyl von Glutamat; 2.) GSH-Synthetase ermöglicht die Reaktion von Glycin mit Cysteincarboxyl des γ -Glutamylcystein um das Tripeptid γ -Glutamylcysteinylglycin zu bilden (Arrik 1984).

Glutathion scheint für eine Vielzahl zytotoxischer Agenzien entgiftend zu wirken.

Beschrieben sind u.a. Effekte bei: Mechlorethamin (Hirono 1961; Goldenberg 1969), Cyclophosphamid (Gurtoo 1981), Adriamycin (Babson 1981), Daunorubicin und Mitomycin C (Arrick 1984).

Der geschwindigkeitslimitierende Schritt im GSH Stoffwechsel bildet die γ -Glutamylcystein-Synthetase (Meister 1988). Eine Überexpression von mRNA der γ -Glutamylcystein-Synthetase konnte bei Nitrosourea behandelten Gliomen nachgewiesen werden (Gomi 1997).

An Hand von Ovarialkarzinomen konnte dieser Effekt auch gegenüber alkylierenden Substanzen sowie cis-Platin dargestellt werden. Ein spezifischer Inhibitor der Glutathion-S-Transferase -Buthionin sulfoximin (BSO)- bewirkt in vitro eine Reversion der Resistenz (Perez 1990).

Eine 15fache Unempfindlichkeit gegen Nitrogen Mustard konnte experimentell bei einer Tumorzelllinie der Ratte erzeugt werden. Die resistenten Zellen zeigten einerseits höhere Konzentration von Glutathion-S-Transferase (GST), andererseits ließen sich mit Hilfe von SDS Gel-Elektrophorese und Western Blot Isoenzyme der GST nachweisen. Insbesondere die Überexpression eines 29,5 kDa großen Isoenzymes der GST scheint für den Nitrogen Mustard resistenten Phänotyp mitverantwortlich zu sein (Clapper 1987). Für eine gegen Doxorubicin selektionierte Brustkrebszelllinie MCF7 gelang der Nachweis einer Überexpression einer neuen anionischen Form der GST (Batist 1986), die als GST π bezeichnet wird.

Erst kürzlich konnte ein Bleomycin detoxifizierendes Enzym gefunden werden: die Bleomycin-Hydrolase mit struktureller Ähnlichkeit zur Cystein-Proteinase (Ferrando 1996). Es besteht für die Bleomycin-Hydrolase eine gute Übereinstimmung zur Ausprägung der Resistenz gegen Bleomycin in der Chemotherapie.

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, daß vermehrte Expression von Metallothionein den Therapieerfolg von cis-Platin limitiert. Metallothioneine sind cysteinreiche Proteine, die in breiter Variation in eukaryonten Zellen vorkommen. Physiologisch spielen sie eine entscheidende Rolle in der Zn²⁺ und Cu²⁺ Homoestase und bei der Detoxifikation von Schwermetallionen. Experimentell konnte in vitro einen Resistenz gegen cis-Platin aufgebaut werden: Einerseits

durch Exposition von Schwermetallionen andererseits durch Transfektion mit einem Bovinen Papilloma Virus, das DNA enthielt, die für humanes Metallothionin-IIA kodiert (Kelley 1988).

Neben einer gesteigerten Inaktivierung durch Überexpression eines protektiven Faktors, kann auch die Herabregulation substrataktivierender Mechanismen zur Ausbildung von Resistenzen führen. Als Beispiel dafür gilt Cyclophosphamid, das über ein Cytochrom P-450 System durch Ringhydroxylierung in α -Stellung zu 4-Hydroxycyclophosphamid überführt wird, welches den Ausgangspunkt darstellt für die Bildung des elektrophilen Aktivierungsproduktes am Ende der Aktivierungskette (Hayes 1990).

Ein anders Beispiel für dieses Form der Chemoresistenz findet sich im Metabolismus der Cytosin Arabinoside (ara-C³) bei verschiedenen Leukämieformen. Ara-C³ ist ein synthetisches Nukleotid, dessen Phosphorylation und Inkorporation in die DNA mit der zytotoxischen Wirkung korreliert. Die ara-C³ resistenten akuten Leukämien zeigten eine signifikant niedrigere Phosphorylation des Therapeutikums (Kessel 1969).

Ein alternativer Weg der Zelle die Konzentration des Zytostatikums intrazellulär zu vermindern, ist die Kompartimentierung. In der von mir benutzten gegen Mitoxantron resistenten Magenkarzinomzelllinie EPG 257-85 RNOV wurde im Interferenz-Mikroskop die Akkumulation von mitoxantronhaltigen Vesikeln -dicht unter der Zellmembran- nachgewiesen. Sensitive Zellen zeigten eine diffuse Verteilung des Mitoxantron mit den Zeichen der toxischen Wirkung: Zerstörung des Zytoplasmas und Karyopyknose (Dietel 1990; Seidel 1995). Vergleichbare Beobachtungen der Kompartimentierung konnten auch bei zahlreichen anderen Zelllinien gemacht werden (Mazzoni 1990; Rutherford 1993; Cornwell 1986).

1.1.3 Verminderte Affinität des Substrates zu den intrazellulären Zielen

Die pharmakologische Wirkung von Methotrexat an der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) besteht in der Inhibition des Folsäurestoffwechsel. In der Zelle bindet MTX schnell an Dihydrofolat-Reduktase und inaktiviert diese dadurch. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung des Pools an Tetrahydrofolsäure (FH4) in dem es Dihydrofolsäure (FH2), das während der Thymidylatsynthese entsteht, reduziert. Die Inhibition der DHFR führt zu einem Abfall der FH4 Konzentration bei gleichzeitiger Akkumulation der FH2 bei bestehender Thymidylatsynthese.

Die Hemmung der Thymidylat-Synthase und die Hemmung der vom Folsäurestoffwechsel abhängigen Purinsynthese bewirken die therapeutisch beabsichtigte Beeinträchtigung der DNA Replikation (Moran 1979).

Es konnte gezeigt werden, daß eine Punktmutation der cDNA an Position 22 der DHFR mit Austausch von Arginin für Leucin zur Ausbildung einer Chemoresistenz führt. Die Mutation fand in einer Region statt, die für die Bindungsstelle des Inhibitors Methotrexat entscheidend ist (Simonsen 1983).

Ebenfalls für Methotrexat ist eine vermehrte Expression der nicht mutierten Dihydrofolat-Reduktase beschrieben worden. Im Wettbewerb von MTX und Dihydrofolsäure um freie Bindungsstellen der DHFR erhält die Zelle mit dieser Genamplifikation den überlebensnotwendigen Folsäurestoffwechsel aufrecht (Cohen 1978, Whit 1975). An Hand einer resistenten Zelllinie von Ovarien des chinesischen Hamsters konnten im Durchschnitt 150 Kopien des Gens innerhalb der DNA dargestellt werden (Nunberg 1978).

Das Zielenzym von 5-Fluorouracil (5FU) ist die Thymidylat-Synthase (Spears 1988). Die Festigkeit der Verbindung von Thymidylat-Synthase und dem 5FU Nucleotid 5F-dUMP ist besonders stark, wenn die Konzentration von reduzierten Folaten erhöht ist (Keyomarsi 1986).

In der Methotrexat insensitive Lymphomzelllinie L5178Y konnten zwei Isoformen der Folat-Reduktase isoliert werden. Die erste besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu MTX und wird sowohl in der sensitiven als auch der insensitive Linie

exprimiert. Die zweite findet sich nur in der insensitiven Linie, wobei dieses Isoenzym der Folat-Reduktase eine sehr geringe Affinität zu MTX zeigt. Die Bindungsfähigkeit zu dem physiologischen Substrat -der Folsäure- ist jedoch geblieben. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Höhe der Expression der MTX-insensitiven Variante der Folat-Reduktase und der Ausprägung der MTX-Resistenz (Goldie 1980).

Weiterhin gibt es vielfältige Hinweise darauf, wie die Topoisomerasen in den Prozeß der Resistenzbildung involviert sind (Glisson 1987). Die Überführung der Topoisomere einer DNA ineinander wird durch Enzyme katalysiert, die man als Topoisomerasen bezeichnet. Diese Enzyme verändern die Windungszahl der DNA, indem sie einen dreistufigen Prozeß katalysieren: 1.) Spaltung eines der beiden Stränge der DNA, 2.) Durchtritt eines DNA-Abschnittes durch die entstandene Lücke und 3.) die Wiederverknüpfung der DNA-Bruchstelle. Die Typ-I Topoisomerasen spalten nur einen DNA-Strang, Enzyme vom Typ II dagegen beide.

Die zytotoxische Wirkung der Epipodophyllotoxine wird durch die Inhibition der Topoisomerase II im dritten Schritt während der Replikation mit der Folge von Doppelstrangbrüchen erklärt. Resistenzen gegen Epipodophyllotoxine rühren von der verminderten Expression der Topoisomerase II und damit der Reduktion des Zielenzym für Topo II inaktivierender Chemotherapeutika (Pommier 1986) her. Da Topo II für die Zellteilung unabkömmlich ist, bestehen Grenzen für die Abnahme der Topo II Konzentration und damit für den Grad der Chemoresistenz im Hinblick auf diesen Mechanismus (Holm 1989).

1.1.4 Gesteigerte Reparatorkapazität der Zelle

Als Schutz vor der Wirkung alkylierender Substanzen konnte als Resistenzmechanismus die vermehrte Synthese von O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (MGMT) aufgedeckt werden (Dempfle 1985, Pegg 1990). O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase schützt die DNA vor den genotoxischen Effekten alkylierender Agenzien, indem sie O⁶-Alkylguaninresiduen wie O⁶-

Methylguanin zu Guanien umwandelt. Dies geschieht unter dem Verlust eines Cysteinrestes auf der aktiven Seite, verbunden mit der irreversiblen Inaktivität der MGMT (Dalby 1994).

Transfektion mit bakterieller MGMT induziert Resistenz gegen Bischloroethyl-Nitrosourea bei zuvor sensiblen Säugetierzellen (Dumenco 1989).

Als Mechanismus der Zytotoxizität von cis-Platin wird die Bindung an die DNA mit konsekutiver Interferenz von Transkription und Replikation angesehen. Die einzige Möglichkeit der Zelle zum weiteren Überleben dieser kovalenten Interaktion besteht in einer effizienten Reparatur dieser Läsion. Einzelheiten des Mechanismus, wie Zellen die potentiell letalen Beschädigungen erkennen und beheben, erfordern das Zusammenspiel einer Vielzahl von Enzymsystemen, welche allgemein als Reparatur durch Herausschneiden oder "excision repair" zusammengefaßt werden (Friedberg 1985). Als Maß für die als "excision repair" subsumierten Reparaturvorgänge dient die Aufnahme von [³H]-Thymidin in die DNA. So zeigte die cis-Platin resistente menschliche Ovarialkarzinom Zelllinie A2780 eine signifikant höhere Aufnahme von [³H]-Thymidin in die DNA als die parentale Zelllinie, gleichsam Ausdruck einer -für die Resistenz notwendigen- gesteigerten Reparatursleistung .

Daß vielfältige Einzelreaktion an der Wiederherstellung Zytostatika induzierter Läsionen beteiligt sind, konnte an Hand der ausschneidenden DNA-Polymerase und den wieder verbindenden Ligasen gezeigt werden (Scanlon 1989). In Übereinstimmung damit führt eine Behinderung der Reparaturvorgänge durch Aphidicolin, einem Inhibitor der DNA-Polymerase- α , zu einem Anstieg der Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika in der zuvor resistenten Linie (Masuda 1988).

Der cyclinabhängige Kinaseninhibitor p21^{WAF1/CIP1} ist essentiell für die Koordination von S- und M-Phase im Zellzyklus. Die Identifizierung von p21 als ein transkriptionelles Ziel von p53 lieferte die molekulare Erklärung für den Zellzyklusstillstand nach Exposition DNAschädigender Agenzien. Da der Stillstand im Zellzyklus der Zelle die Möglichkeit gibt, DNA-Schäden vor der Replikation zu reparieren, kann der Verlust von p21 zu einer Zunahme der Chemosensitivität führen. In vitro konnte bei p21^{-/-} Zellen eine defiziente Reparatur nach Schäden,

die durch ultraviolettes Licht oder zytotoxischen Stoffen verursacht wurden, festgestellt werden. Es scheint sich herauszukristallisieren, daß die cyclinabhängigen Kinaseninhibitoren p21 und p16 die Apoptose wirksam verhindern und chemoprotektiv wirken können (Waldman 1996).

1.1.5 Geringere intrazelluläre Konzentration durch einen transportproteinabhängigen auswärtsgerichteten Substratstrom

1.1.5.1 Das Phänomen der Vielfachresistenz oder Multidrug Resistance

Das Auftreten einer pleiotropen Resistenz gegen eine Vielzahl strukturell bzw. funktionell unterschiedlicher Agenzien wird als Multidrug Resistance (MDR) bezeichnet. Der MDR Phänotyp schließt eine Kreuzresistenz gegen Anthrazycline (Doxorubicin, Daunorubicin), Epipodophylltoxine (Etoposid), Vinca Alkaloide (Vinblastin, Vincristin), Taxol und andere Gruppen ein. Anfänglich durchgeführte physiologische und pharmazeutische Studien zeigten Hinweise auf eine verminderte Anreicherung des Therapeutikums in der Zelle (Kessel 1968). Als Ursache dafür wurden ein vermehrter Auswärtstransport (Dano 1973) bzw. eine verminderte Zellpermeabilität (Ling 1974) diskutiert.

Zu den bisher bekannten Mechanismen die zur MDR führen, werden die vermehrte Expression von P-Glykoprotein (PGP) sowie dem Multidrug Resistenz assoziierten Protein (MRP) und Lungen-Resistenz-Protein (LRP) gezählt.

PGP und MRP gehören zu der Familie der ABC-Transporter, die als gemeinsames Merkmal der molekularen Architektur zwei große transmembranäre Domänen und zwei nukleotidbindende Domänen (NBD) mit Bevorzugung von ATP besitzen (Higgins 1992). Gemäß den Schwierigkeiten große Membranproteine zu kristallisieren, konnten die dreidimensionalen Strukturen im einzelnen nicht hinlänglich geklärt werden.

Zahlreiche eukaryonte und prokaryonte ABC Proteine sind dahingehend beschrieben worden, in den Transport von Molekülen und Ionen involviert zu sein

(Higgins 1992). Besondere strukturelle Verwandtschaft zum MRP bestehen für den erst kürzlich identifizierten Sulfanylharnstoffrezeptor (SUR) (Aguilar-Bryan 1995) und dem Zystischen Fibrose transmembranären Konduktanz Regulator (CFTR) mit 19% Aminosäurenübereinstimmung (Riordan 1989, Stutts 1992). Weiterhin besteht 32% Aminosäurenübereinstimmung zu ItpgpA, einem Leishmania Protein, das u. a. Resistenz gegen Arsen vermittelt (Papadopoulou 1994). Schließlich zwei Hefe Proteine, zum einen YORI, welches Oligomycinresistenz vermittelt (Katzmann 1995) und YCF1 mit 43% Aminosäurenübereinstimmung zu MRP im Zusammenhang von Resistenzbildung gegen Cadmium (Szczypka 1994).

1.1.5.2 Das P-Glykoprotein

Die Entdeckung des P-Glykoproteins brachte ausgedehnte Studien zum Wirkungsmechanismus, wie auch der klinischen Bedeutung dieses Phänomens mit sich. Erstmalig konnte 1976 die Überexpression dieses Proteins in einer Zelllinie des chinesischen Hamsters nachgewiesen werden (Juliano 1976).

PGP ist ein 170 kDa großes transmembranäres Protein das einen ATP abhängigen Pumpmechanismus unterhält (Gerlach 1986; Pastan 1987). Entsprechend der vermuteten Funktion im Prozeß der natürlichen Detoxifikation der Zelle, findet sich PGP auch in normalen menschlichen Geweben, insbesondere solcher mit sekretorischer oder schrankenbildender Funktion, wie auch in peripheren Blutzellen.

Das für PGP kodierende Gen wird als MDR1 bezeichnet (Gros 1986; Ueda 1986). Das MDR1 Gen ist 100 kb groß und enthält 29 Exons. Es gehört zu einer kleinen Familie von zwei in menschlichen Zellen vorkommenden Genen (MDR1/MDR2), sowie drei Mitgliedern von Nagetieren (Chinesischer Hamster: pgp1, 2 und 3; Maus: mdr1a/1b und mdr2). Transfektion mit MDR Genom oder genspezifischer cDNA zeigten, daß das MDR1 Gen alleine zur Ausbildung des MDR Phänotyps

ausreicht.

PGP, das Genprodukt von MDR1, besteht aus 1280 Aminosäuren und enthält zwei homologe Hälften. Jede Hälfte hat sechs membranübergreifende Domänen, die drei transmembranäre Schleifen bilden und eine intrazelluläre Bindungsstelle für ATP; eine Verminderung des intrazellulären ATPs bedingt folgerichtig einen Anstieg der Chemosensibilität (Broxterman 1988).

PGP unterhält einen energieabhängigen Efflux von hydrophoben xenobiotischen Agenzien; die natürlichen endogenen Substrate sind bisher unbekannt (Cornwell 1987; Pastan 1987).

Zum Mechanismus der Regulierung der Expression von PGP ist bekannt, daß er bei den meisten Nagetierzelllinien über eine Genamplifikation abläuft (Van der Bliek 1989). Im Gegensatz dazu finden sich in menschlichen Zelllinien eher eine Aktivierung der Transkription (Shen 1986; Van der Bliek 1988; Baas 1990). In klinischen Beispielen der PGP Überexpression konnte eine Genamplifikation überhaupt nicht nachgewiesen werden (Goldstein 1989; Rothenberg 1989).

1.1.5.3 MRP, das mit Vielfachresistenz assoziierte Protein

Hinweise auf ein neues von PGP unabhängiges Transportsystem ergaben sich aus Untersuchungen an der Leukämiezellreihe HL60/ADR (McGrath 1988). Die Isolierung dieses membranären Transportglykoproteins gelang allerdings an einer P-Glykoprotein negativen Linie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms H69AR, das schrittweise mit Doxorubicin selektioniert wurde (Mirski 1987). Keiner der bis dahin bekannten Resistenzmechanismen konnte als Erklärungsmodell dafür dienen. Die Identifizierung einer 6,5 kb großen mRNA, die in H69AR ca. 100fach überexprimiert war, führt über die Sequenzierung eines cDNA Klonen dieser mRNA zur Entdeckung des MRP (Cole 1992a). Untersuchungen an anderen Zelllinien zeigten, daß sich bei den meisten PGP unabhängigen Multiresistenzen eine Überexpression von MRP nachweisen läßt (Krishnamachary 1993; Barand

1994; Slovak 1993; Sumizawa 1994; Zamam 1993).

MRP gehört zu der ATP bindenden Familie der membranständigen Transportproteine mit geringer sequentiellen Homologie zu PGP. Transfektion von MRP cDNA in menschliche Tumorzellen resultiert Vielfachresistenz (Grant 1994).

Als MRP Genlokus konnte das Chromosom 16p13.13-13.12 detektiert werden (Krishnamachary 1993; Slovak 1993). Fernerhin konnte gezeigt werden, daß eine Genverstärkung zu einer vermehrten Expression von MRP mRNA in den in vitro selektierten Zellen beiträgt (Cole 1992a; Slovak 1993), welche Verstärker-Domänen von komplexen Ursprung besitzen (Ray 1994). Die Überexpression von MRP kann also einerseits durch eine Amplifikation des kodierenden Gens am ursprünglichen Genort erfolgen (Slovak 1993), oder andererseits auf anderen Chromosomen wie etwa 1,6 oder 7. Es finden sich allerdings auch zahlreiche Hinweise darauf, daß eine vermehrte Produktion von MRP auch ohne Genamplifikation stattfinden kann (Cole 1992a; Eijdem 1995). Eine Analyse des Initialpromoters vom MRP Gen zeigt multiple Startpunkte für die Transkription und übereinstimmende Bereiche für eine positive oder negative Regulation (Zhu 1994).

Für die dreidimensionale Struktur des 1531 Aminosäuren großen MRP existieren verschiedene Modelle. Die größte Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der ABC Familie besteht in den Nukleosid bindenden Domänen (NBD). Die erste Vorhersage für die Sekundärstruktur des MRP beinhaltete ein Molekül mit acht transmembranären Domänen auf der N-terminalen- und vier auf der Carboxylseite, jede Seite jeweils einmal N-glykosyliert (Cole 1992a, Cole 1993). Alternativ dazu besteht das Modell von Loe, das 11-12 N-terminale und sechs carboxylterminale Segmente beinhaltet, wobei in den ersten 230 Aminosäuren fünf oder sechs Segmente auf der N-terminalen Seite liegen (Loe 1996). Auf Grund struktureller Ähnlichkeiten mit dem CFTR kommt die Arbeitsgruppe um Bakos zu einer Vorhersage des Aufbaues, die drei membraneingebundene Regionen beinhaltet, die von großen zytoplasmatischen Schleifen voneinander getrennt sind. Basierend auf den Analysen des hydrophobischen Kräfteverhältnisses, konnten zwei mögliche Varianten der Glykolisierungsregion auf der N-terminalen Seite vorhergesagt werden (Bakos 1996).

Transfektion mit HeLa und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien sicherten die Erkenntnis, daß mit einer Überexpression von MRP eine Resistenz gegen eine Vielzahl wichtiger Chemotherapeutika assoziiert ist (Grant 1994; Zaman 1994). Dazu gehören Doxorubicin, Vincristin, Vinblastin und Etoposid; weniger betroffen sind davon Mitoxantron und Taxol.

Im Gegensatz zu P-Glykoprotein kann MRP als sogenannte GS-X-Pumpe (ATP-dependent glutathione S-conjugate efflux pump) wirken, bei der ein Transport der mit GSH konjugierten chemotherapeutischen Agenzien aus der Zelle stattfindet (Jedlitschky 1996).

MRP exprimierende Zellen zeigen einen ATP abhängigen Transport von Leukotrien C₄ (LTC₄) und S-2,4-Dinitrophenyl Glutathion in Membranvesikeln als Hinweis auf einen Glutathion-S-Konjugate vermittelten auswärtsgerichteten Pumpmechanismus (Leier 1994, Zaman 1994).

Dieser engen Koppelung von Glutathiondetoxifikation, wie sie oben beschrieben wurde, und dem MRP vermittelten Auswärtstransport kommt eine wichtige Rolle in der Ausbildung des vielfachresistenten Phänotyps zu.

Es ist bekannt, daß reduzierte GSH kein Substrat für MRP darstellt (Muller 1994); allerdings bestehen Hinweise darauf, daß MRP mit GSH im Sinne eines Cotransportes einen Auswärtstransport aufrechterhalten kann (Rappa 1997).

Neben GSH-Konjugaten stellen auch glukorinierte und sulfatierte endogene und exogen Produkte ein Substrat für MRP dar (Jedlitschky 1996).

Schließlich gibt es Hinweise darauf, daß für MRP1 Homologe existieren, die am Phänomen der MDR beteiligt sind. Dazu werden das cMOAT oder auch MRP2 genannte Protein gezählt, das in Menschen- und Nagetierzelllinien gefunden wurde (Paulusma 1996; Ito 1997; Taniguchi 1996). cMOAT, das eine 49% Übereinstimmung mit MRP1 auf Proteinebene besitzt, arbeitet ebenfalls als GS-X Pumpe und befindet sich in erster Linie in den kanikulären Membranen der Hepatozyten. Eine Recherche in der EST Bibliothek (expressed sequence tag) brachte weitere MRP1 Homologe zu Tage, die als MRP3, MRP4 und MRP5

bezeichnet werden, deren Rolle in der Ausprägung des MDR Phänotyps im einzelnen noch ungeklärt sind (Kool 1997).

1.1.5.4 Das Resistenzprotein der Lunge

Die Entdeckung des Resistenzproteins der Lunge (LRP) zeigt einen möglichen Weg zur Entwicklung einer Chemoresistenz auf, der nicht durch ein Protein vermittelt wird, das aus der Familie der ABC-Transporter stammt (Scheper 1993; Scheffer 1995). Vielmehr gehört es zu der Gruppe der Vault-Proteine, deren ungewöhnliche Struktur es vermuten lassen, Teil des Zellkern-Porenkomplexes zu sein (Rome 1995). Erstmals in einer Zelllinie eines Bronchialkarzinomes detektiert, konnte es auch in den meisten anderen Neoplasien nachgewiesen werden, deren Chemoresistenz nicht auf eine Expression von P-Glykoprotein zurückzuführen war.

LRP ist ein 110 kDa großes Protein, daß ähnlich wie PGP im natürlichen Gewebe an xenobiotisch exponierten Stellen vermehrt exprimiert wird, ausgenommen die Gallenkanäle, wo sich zwar PGP aber kein LRP nachweisen läßt (Izquierdo 1996b). Mit dem Lungenresistenzprotein spezifischen Antikörper LRP-56b gefärbt, findet es sich in erster Linie zytoplasmatisch in groben Granula; ein Hinweis darauf, daß es mit einem Molekül interagiert, das mit vesikulären bzw. lysosomalen Strukturen assoziiert ist (Scheper 1993). Die cDNA, die für das LRP kodiert, konnte an der menschlichen Fibrosarkomzelllinie HT1080/DR4 isoliert werden. Dual-Color-Fluoreszenz Hybridisation konnten als Genort das chromosomale Segment 16p11.2 lokalisieren -etwa 27 cM in der Nähe des MRP Locus (Scheffer 1995).

Über die Funktion des Lungenresistenzprotein besteht nach wie vor Unklarheit. In Analogie zur anderen Vaults nimmt man an, daß LRP an der Regulation des nukleozytoplasmatischen bzw. vesikulären Transportes verschiedener Substrate teilnimmt. Gestützt wird diese These von der Beobachtung einer verminderten

nukleo-/zytoplasmatischen Konzentration und der Exozytose in Vesikeln von Chemotherapeutika in LRP überexprimierenden Zellen (Schoorhuis 1991).

1.1.6 Weitere Aspekte zur Entwicklung der Chemoresistenz

1.1.6.1 Weitere Alternativen

Neben den oben erwähnten näher vorbeschriebenen Mechanismen, die zu einer Chemoresistenz führen können, gibt es zahlreiche Hinweise darauf, daß noch weitere Faktoren eine Rolle spielen.

In einer Actinomycin (ACT-D) resistenten Brustkrebszelllinie MDA-231 konnte nachgewiesen werden, daß epidermaler Wachstumsfaktor und der insulinähnliche Wachstumsfaktor-1 Zellen vor dem ACT-D induzierten Zelltod schützen (Geier 1994). Der genaue Mechanismus ist nicht sicher aufgeklärt, jedoch sind Wachstumsfaktoren dafür bekannt, als Stimulatoren für die Synthese von Makromolekülen zu dienen (Pusztai 1993).

Ungeklärt ist auch die Rolle eines 85 kDa großen Membranproteins, das in zahlreichen Adriamycin resistenten Tumoren durch monoklonale Antikörper nachgewiesen werden konnte. Die Expression dieses Proteins scheint relativ spezifisch für die Resistenzbildung gegen Adriamycin zu sein, da es in keiner mit anderen Chemotherapeutika selektionierten Zelllinie vorkommt (Hamada 1988).

Darüber hinaus existieren noch zahlreiche Darstellungen anderer Faktoren, die - zum Teil nur als Einzelberichte- im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Chemoresistenz bei malignen Tumoren erwähnt werden, deren ausführliche Schilderung aber den Rahmen dieser Einleitung bei weitem sprengen würden.

Interessant ist auch eine Beobachtung, die an Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu normalen Nierengewebe gemacht wurde: In den Nierentumorzellen fanden sich erhöhte mRNA Spiegel der menschlichen mutT Homologe (hMTH1); hMTH1 ist daran beteiligt, daß 8-oxo-dGTP, die oxydierte Form der dGTP, nicht in die DNA

inkorporiert wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß hMTH1 während oxydativen Stresses vermehrt gebildet wird und nicht nur der Ausdruck einer genetischen Instabilität sonder einer Assoziation mit Chemoresistenz darstellt, was letztlich aber noch nicht bewiesen ist (Okamoto 1996).

1.1.6.2 Die Rolle der Onkogene in der Entwicklung einer Chemoresistenz

Onkogene beeinflussen und steuern das Wachstum und die Teilung einer Zelle. Sie können die Geschwindigkeit des Zellzyklus ändern und Zellen in denen sie überexprimiert werden an der Apoptose hindern. Auf Grund dieser Eigenschaften sind Onkogene bevorzugter Gegenstand der Untersuchung im Hinblick auf intrinsischer oder erworbener Chemoresistenz.

Das Onkogen *Her-2/neu* kodiert für ein 185 kD großen transmembranären Rezeptor -ähnlich dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor- mit entsprechender Tyrosin-Kinase-Aktivität. Das Vorhandensein von *Her-2/neu* ist mit weit fortgeschrittener Erkrankung und schlechtem Überleben verbunden. Am Beispiel des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomes konnte gezeigt werden, daß dessen Chemoresistenz nicht vom MDR1 Phänotyp abhängig ist, sehr wohl aber eine enge Korrelation mit der *Her-2/neu* Expression im Hinblick auf eine primäre Resistenz besteht (Tsai 1993).

Für *Bcl-2* -ein 26 kD großes Protein- sind verschiedenen Wege bekannt, den programmierten Zelltod durch *c-myc*, *p53* oder anderer DNAschädigender Stoffe aufzuhalten. Eine Assoziation mit der Ausbildung einer Chemoresistenz durch *Bcl-2* wird vermutet, allerdings finden sich auch Gegenbeispiele, die diese Überlegung nicht stützen. Gefunden wurden erhöhte Spiegel an *Bcl-2* in cisplatinresistenten Ovarialkarzinomen; eine exogene Zufuhr von *Bcl-2* in zuvor sensitive Zellen schützt diese vor der Apoptose. Im Gegenzug kann die Blockade von *Bcl-2* durch Transfektion mit antisense Oligonukletiden oder Plasmiden die zytotoxischen Effekte von Chemotherapeutika in vitro verstärken (Eliopoulos 1995).

Der Wildtyp von *p53* ist ein Tumorsuppressorgen und wirkt als starker Induktor der Apoptose in der Folge DNAschädigender Einflüsse. Mutationen an *p53* sind bei

Tumoren sehr häufig zu finden. In vielen Studien konnte gezeigt werden, daß der Verlust der *p53* Funktion assoziiert ist mit Tumorprogression, genetischer Instabilität, schlechter Prognose und Chemoresistenz (Velculescu 1996). Weiterhin berichten andere Studien darüber, daß Zellen mit einem mutierten *p53* System eine verminderte Expression von *Bcl-2*-Homologe und *bax* zeigen, als Zeichen dafür, daß in diesen Fällen der Verlust von *bax* in der Ausbildung einer Chemoresistenz resultiert (Thomas 1996).

Desweiteren werden *c-myc* und *ras* als klassische Onkogene im Zusammenhang von Chemoresistenz genannt (Sklar 1991).

Schließlich sind sowohl für *c-jun* als auch für *c-fos* bekannt, daß sich ihre Expression durch Chemotherapeutika induzieren läßt und sich in chemoresistenten Zelllinien erhöhte Spiegel finden. Außerdem sind *c-jun* und *c-fos* in der Regulation der GST- π Expression beteiligt, als mögliche Ursache für ihre Wirksamkeit im Zusammenspiel der Chemoresistenz (Moffat 1994).

1.2 Allgemeine Aspekte zur 2-D-Elektrophorese im immobilisierten pH-Gradienten

Die 2-D-Elektrophorese stellt eine Methode zur Analyse komplexer Proteingemische dar. Das zu Grunde liegende Prinzip besteht zum einen aus einer Auftrennung nach den isoelektrischen Punkten (erste Dimension) und zum anderen in einem zweiten Arbeitsschritt, in der elektrophoretischen Beweglichkeit im Polyacrylamidgel (zweite Dimension).

Seit der Etablierung dieser Technik Ende der 60er Jahre durch Dale und Latner (Dale 1969), Macko und Stegemann (Macko 1969) sowie Margolis und Kenrick (1969), die die Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen mit wasserlöslichen Proteinen durchführten, erfuhr die Methode zahlreiche Änderungen und Verbesserungen.

Durch die 1975 von Klose (Klose 1975) und O'Farrel (O'Farrel 1975) eingeführte Denaturierung der Proteine in einem Gemisch aus Harnstoff und Dithiothreitol bzw. Harnstoff, Dithiothreitol und Nonidet P-40, wurden auch wasserunlösliche

Proteine der Methode zugänglich. Hochmolarer Harnstoff dissoziiert die Wasserstoffbrückenbindungen; Chaps bzw. Nonidet P-40 lösen hydrophobe Bindungen auf. Schließlich vermag Dithiothreitol als reduzierende Thiolverbindung die Quartärstruktur der Proteine zu spalten.

Die zweite Dimension fand ihre entscheidende Verbesserung in der Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) (Shapiro 1967).

Eine Weiterentwicklung in Richtung einer apparativen Unterstützung der Arbeitsweise für eine Routine-Analytik wurde von Anderson durch das Iso-Dalt-System geliefert (Anderson 1982).

Das sich daraus ergebende Konzept der isoelektrischen Fokussierung mit Trägerampholyten in harnstoff- und detergenzienhaltigen Polyacrylamidgelen in der ungenügenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Ein Teil dieser Probleme konnte durch die Standardisierung der Arbeitsvorschriften, Geräte und Chemikalien überwunden werden (Anderson 1988). Ungelöst blieb jedoch das Problem der Proteinpräzipitation nahe des isoelektrischen Punktes oder auch die Generierung enger pH-Gradienten. Von entscheidendem Nachteil waren jedoch die divergierenden Fokussierungsmuster, die zum einen von den verwendeten Trägerampholyten, zum anderen durch die Kathodendrift von der Fokussierungszeit abhängen (Chrambach 1973).

Abhilfe brachte erst die Einführung des immobilisierten pH-Gradienten (IPG) in der ersten Dimension der zweidimensionalen Elektrophorese (Bjellqvist 1982).

Immobilisierte pH-Gradienten unterscheiden sich grundsätzlich von den mit Trägerampholyten erzeugten pH-Gradienten, da sie in die Gelmatrix kopolymerisiert werden und somit im elektrischen Feld weder auf- noch abgebaut werden. Der Verlauf des immobilisierten pH-Gradienten ist unbeeinflusst von der Produktionscharge, da die Erzeugung eines IPG anstelle eines heterogenen Synthesegemisches, bestehend aus hunderten unterschiedlichen Trägerampholyten, entfällt. Die chemische Struktur der Immobiline war lange Zeit, bis auf die Tatsache, daß es sich um Acrylamidverbindungen handelt, unbekannt. Es ist das Verdienst von Rhigetti und seiner Arbeitsgruppe, wesentliche Beiträge zur Synthese und Reinigung der Substanzen beigetragen zu haben. (Chiari 1989a; Chiari 1989b). Der Gradient driftet nicht in Abhängigkeit der

Fokussierungszeit in Richtung Kathode, sondern ist stabil. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, einen pH-Gradienten noch vor der isoelektrischen Trennung aufzubauen, so daß die Proteine genügend Zeit haben, zu ihren tatsächlichen isoelektrischen Punkten zu wandern. Es resultiert ein zeitunabhängiges Fokussierungsmuster, wodurch die Reproduzierbarkeit der Protein-Spot Positionen in der ersten Dimension erhöht wird.

Das von mir benutzte 2D-Elektrophorese Konzept basiert im wesentlichen auf den von Rabilloud vorgestellten Arbeitsvorschriften (Rabilloud 1994). Dabei werden die Proteinproben nicht unilokulär auf einen Gelstreifen der ersten Dimension aufgetragen, sondern im Rehydratisierungsschritt vom Gel aufgenommen. Während des zwölfstündigen Rehydratisierungsvorganges haben die Proteine die Möglichkeit, entlang des zuvor generierten pH-Gradienten ihre Position im Gel einzunehmen. Das darauffolgende Anlegen des elektrischen Feldes dient der Fokussierung und damit der eigentlichen Auftrennung.

2 Fragestellung

Die Chemotherapie kann bei der Behandlung maligner Neoplasien aus vielerlei Gründen versagen, wobei die Ausprägung einer Resistenz die wichtigste Ursache darstellt. Die Resistenz kann primär, d.h. von Anfang der Therapie bei Tumoren vorliegen, oder sich erst sekundär im Laufe des Einsatzes chemotherapeutisch wirksamer Stoffe entwickeln.

Die Ursache der Chemoresistenz scheint -bei Betrachtung auf der molekularen Ebene- darin zu liegen, daß insbesondere der Transport des Therapeutikums aus der Zelle heraus durch evolutionär alte und unspezifische Proteine, wie dem P-Glykoprotein, den entscheidenden Anteil am Mißlingen der Behandlung hat.

Es bestehen Hinweise darauf, daß diese Mechanismen, die zur Ausbildung von primärer und sekundärer Resistenz führen ähnlich, wenn nicht sogar identisch sind. So konnte in nicht chemotherapeutisch vorbehandelten, primär resistenten Tumoren das P-Glykoprotein nachgewiesen werden, insbesondere in denen, deren Ausgangsgewebe schon physiologisch mehr als andere Zellverbände P-Glykoprotein exprimiert haben.

Andererseits konnte gezeigt werden, daß in Geweben, die normalerweise kein Vorhandensein von P-Glykoprotein aufweisen, dieses -allein durch ihre maligne Transformation- schon vor Einsatz von Chemotherapeutika auch exprimieren (Borst 1991).

Allein für das Studium der beteiligten Faktoren eignet sich die Untersuchung der sekundären Resistenz besser, da es hier eine, in Form einer chemosensitiven Ausgangszelllinie, korrespondierende Population gibt, an Hand der -im direkten Vergleich- die Unterschiede ermittelt werden sollen, die letztlich für die Ausprägung des resistenten Phänotyps verantwortlich sind.

Wie oben gezeigt, sind auf diese Weise zahlreiche Faktoren gefunden worden, die zu einem kleineren wie auch größeren Teil an der genetischen und molekularen Ursache der Chemoresistenz beteiligt sind. Die Entwicklung auf diesem Gebiet zeigt, daß es sehr wahrscheinlich noch zahlreiche weitere bislang unbekannte Aspekte gibt, die alleine, oder in Assoziation zu den schon bekannten

Mechanismen, an der Ausprägung des resistenten Phänotyps beteiligt sind.

Mit der zweidimensionalen Elektrophorese im immobilisierten pH-Gradienten steht eine wirksame Methode zu Verfügung, in einem komplexen Gemisch von zellulären Proteinen eine Ordnung zu finden und als deren Resultat Proteinkarten eines Zellklones zu erstellen, die dann visuell miteinander verglichen werden können. Dies geschieht im Hinblick und zum Nachweis einer veränderten Expression eines Genproduktes, unter der Vorstellung, daß es sich bei dieser Änderung um einen Aspekt der Chemoresistenz handelt.

Dabei sind Effekte einer Überexpression, wie bei dem vielfachresistenzassoziierten P-Glykoprotein, aber auch die Herabregulation eines Genproduktes zu beachten, wie das Beispiel der Topoisomerase II zeigt.

Für meine Arbeit standen Zelllinien eines Fibrosarkomes und Mammakarzinomes, die in vitro gegen Mitoxantron selektiert wurden, sowie Zelllinien von Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und Kolonkarzinom zur Verfügung, die einerseits gegen Mitoxantron, andererseits gegen Daunorubicin eine Resistenz entwickelt hatten.

Mit dem Extrakt der zellulären Proteine der parentalen wie auch resistenten Zellklone wurden mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese Proteinkarten erstellt, die dann rechnergestützt verglichen wurden.

Ziel dieser Arbeit ist es, Unterschiede in der Proteinexpression von chemoresistenten im Vergleich zur parentalen Ausgangslinien zu finden, um auf Proteinebene neue Faktoren zu detektieren, die mit dem chemoresistenten Phänotyp assoziiert sind.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellproben

Für die Durchführung der zweidimensionalen Elektrophorese stand Material folgender Zelllinien zu Verfügung (Tab. 1), die mir freundlicherweise von Prof. Dr. M. Dietel (Charité) überlassen wurden:

Tabelle 3.1

Ausgangstumor	Zelllinie	Selektion
Magenkarzinom	EPG85-257P	Ø
	EPG85-257RNOV	Mitoxantron
	EPG85-257RDB	Daunorubicin
Pankreaskarzinom	EPP85-181P	Ø
	EPP85-181RNOV	Mitoxantron
	EPP85-181RDB	Daunorubicin
Kolonkarzinom	HT29P	Ø
	HT29RNOV	Mitoxantron
	HT29RDB	Daunorubicin
Mammakarzinom	MDA-MB-231P	Ø
	MDA-MB-231RNOV	Mitoxantron
Fibrosarkom	EPF86-079P	Ø
	EPF86-079RNOV	Mitoxantron

Die von mir benutzten Tumorzelllinien nach Ausgangsgewebe und mit der entsprechenden im weiteren Text benutzten Nomenklatur.

Die entnommenen Gewebe wurden in einem serumfreien Medium zunächst mechanisch und dann enzymatisch mit 0,1 U/ml Kollagenase und 0,8 U/ml Dispase (Boehringer, Deutschland) zerkleinert. Nach Zentrifugation mit 600 U/min bei 25° C wurde das Sediment auf Kulturflaschen (Falcon, Deutschland) ausgesät. Als Kulturmedium wurde Leibovitz L 15 (Boehringer, Deutschland) genutzt,

bestehend aus 5% Kälberserum (Biochrom, Deutschland), 500 µg Glutamin, 3,1 mg Fetuin, 40 IE Insulin, 1,25 mg Transferrin, 0,56 g NaHCO₃, 5 ml essentielle Vitamine und 250 mg Glucose (Sigma, Deutschland) auf je 500 ml.

Die Selektionierung erfolgte schrittweise über max. 120 Tage, beginnend mit 0,001 µg/ml mit Daunorubicin (Farnitalia, Deutschland) bis 2,4 µg/ml und für Mitoxantron (Cyanamid/Lederle, Deutschland) bis 0,2 µg/ml, ausgenommen für EPP85-181RNOV bis 0,02 µg/ml (Dietel 1987; Dietel 1990).

3.1.2 Reagenzien

Von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) wurden CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamino]-Propansulfat), DTT (1,4-Dimercaptobuten-2,3-Diol), Spermine und Taurin bezogen.

Die Immobiline II mit den pK-Werten 3.6, 4.6, 6.2, 7.0, 8.5, 9.3, Repel-Silan, Gel Bond PAG für Polyacrylamidgele, Pharmalyte und Ampholine im Bereich von pH 3 bzw. 3,5 bis pH 10 für IEF, sowie die Glasplatten zum Gießen der Gele wurden von Pharmacia Biosystems (Uppsala, Schweden) geliefert.

Von Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA) kamen: Bis (N-N'-Methylene-bis-acrylamide), TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylendiamin), APS (Amoniumpersulfat), Coomassie Brilliant Blue R-250, Acrylamid, SDS (Natriumlauryl-sulfat).

Alle anderen Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.A. lieferte Merk (Darmstadt, Deutschland).

3.1.3 Geräte

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde auf einem Dynatech MR 5000 Photometer durchgeführt.

Für die Zentrifugarbeiten wurde eine Eppendorf Centrifuge 5402 benutzt.

Zur pH-Messung diente das 763 Multicalimatic pH-Meter von Knick (Berlin, Deutschland).

Die Herstellung von immobilisierten pH-Gradienten geschah in rechnergesteuerte Büretten der Firma Desaga (Heidelberg, Deutschland). Als Steuerplattform diente ein Apple II.

Für die erste Dimension wurden Multiphor II 2117 Electrophoresis Unit als

Elektrophoresekammer und für die Stromversorgung Electrophoris Power Supply EPS 3500 XL, beide von Pharmacia Biosystems (Uppsala, Schweden), verwendet.

Die Gele der zweiten Dimension wurden in der Protean™ II Multi-Gel Casting Chamber von Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA) gegossen.

Die Auftrennung der Gele entsprechend ihrer Molekulargewichte fand in der Protean II Multicell Elektrophoresekammer von Bio-Rad Laboratories (Richmond, USA) statt. Die Stromversorgung lieferte ein Power PAC 350 System, ebenfalls von Bio-Rad. Die Kühlung besorgte ein colora FK350 Flüssigkeitsumwälzer.

3.2 Methodik

3.2.1 Zweidimensionale Elektrophorese im immobilisierten pH-Gradienten

3.2.1.1 Aufarbeitung der Zellen

Pro Gefäß werden 3 ml eines Lösungspuffers bestehend aus 9 M Harnstoff, 4% CHAPS, 20 mM Spermine, 40 mM DTT und 0,4% Pharmalyte (40%) auf den Zellrasen pipettiert. Nach 45 Minuten beständiger Aequilibrierung des Ansatzes wurde dieser abpipettiert und je Zelllinie in einem Zentrifugenröhrchen gepoolt und 15 Minuten im Coulter Mixer geschüttelt. Die Lösung wird zu je 1 ml Aliquots auf Eppendorfhütchen verteilt und eine Stunde lang bei 4°C mit 14000 U/min zentrifugiert.

Es folgt eine photometrische TCA-Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Dynatech MR5000. Nicht zum sofortigen Gebrauch benötigte Lösungen werden zu diesem Zeitpunkt bei -80° C eingefroren.

3.2.1.2 Erstellen der Gele für die erste Dimension mittels eines rechnergestützten Programms zur Generierung des pH-Gradienten

Die Polyacryamid-Gele für die erste Dimension werden als 180×160×1 mm große Platten auf einem Träger-Gel-Bond PAG erstellt. Das Gießen erfolgte mit Hilfe dreier rechnergesteuerter Büretten, von denen die erste die saure und die zweite die basische Lösung enthielt. Die dritte Bürette enthielt 2,5 % Amoniumpersulfat zur Polymerisation.

Die Gele werden bei 50° C eine Stunde lang auspolymerisiert und zur Beseitigung von Immobilineesten in 2 % Glycerin für jeweils 20 Minuten gewaschen, anschließend getrocknet, in 160×5 mm messende Streifen geschnitten und bei -20° C eingefroren.

Tabelle 3.2

	Bürette 1 pH = 4,0	Bürette 2 pH = 8,0	Bürette 3
Immobiline pK 3,6	4515 μ l	0 μ l	
Immobiline pK 4,6	1945 μ l	3690 μ l	
Immobiline pK 6,2	1805 μ l	2395 μ l	
Immobiline pK 7,0	900 μ l	945 μ l	
Immobiline pK 8,5	1300 μ l	2230 μ l	
Immobiline pK 9,3	0 μ l	1920 μ l	
T30C2.7	13,4 ml	13,4 ml	
KBr (30%)	30,66 ml	8,34 ml	
1 M Tris-Mops	14,4 ml	12,5 ml	
Temed	172 μ l	150 μ l	
Amoniumpersulfat			1 g
Volumen	115 ml	100 ml	50 ml

Arbeitsprotokoll zur Erstellung einer Charge Gele für die erste Dimension. Bürette 1 enthielt die Lösung für den sauren, Bürette 2 die für den basischen pH-Bereich. Bürette 3 enthielt das zur Polymerisation notwendige Amoniumpersulfat.

3.2.1.3 Vorbereitung für die Elektrophorese der ersten Dimension

Die Gelstreifen wurden in einer 5% Glycerin-Lösung erneut gewaschen und anschließend für 12 Stunden im Kaltluftstrom getrocknet.

Nach Einlegen der Gelstreifen in die Quellkammer nach Rabilloud wurden von den zuvor erstellten Zelllinienlösungen Aliquots gebildet, die jeweils 1,5 mg Protein enthielten und mit 9 M Harnstoff, 4% Chaps, 20 mM Spermine, 40 mM DTT auf 1050 µl aufgefüllt wurden. Zu diesem Ansatz kamen je 10 µl 0,4 % Pharmalyte pH 3-10, Ampholine pH 3,5-10, 0,2% NP-40(20%), 0,1% Na-taurodesoxycholat (10%) und 0,01% Orange G (10mg/ml) dazu. Die Rehydrierung der Gelstreifen erfolgte über einen Zeitraum von 12 Stunden (Gelfi 1984).

Für die präparativen Läufe wurden pro Gel 5 mg Protein aufgetragen.

3.2.1.4 Starten der ersten Dimension

Die Gele wurden aus der Quellkammer genommen und die überschüssige Proteinlösung abgetupft. Nach Einlegen in die Elektrophoresekammer (Multiphor II 2117 Electrophoresis Unit), stellte angefeuchtetes Filterpapier auf den Gelenden den elektrischen Kontakt her und gegen das Austrocknen der Gele schützte eine ausreichend dicke Schicht Paraffin.

Das Elektrophoreseprogramm (Electrophoris Power Supply EPS 3500 XL) wurde gestartet:

Tabelle 3.3

Spannung in V	Zeit in Minuten	I = const. 5 mA
150	30	
300	150	
700	30	
1500	30	
2000	30	
3000	540	

Elektrophoreseprogramm für die erste Dimension. Die Spannung wird langsam erhöht, um unerwünschte stärkere Ionenbewegungen im Gel zu vermeiden. Anschließend werden die Proteine für 9 Stunden bis zum Erreichen der 60 kVh fokussiert.

3.2.1.5 Erstellen der Gele für die Elektrophorese der zweiten Dimension

Zur Herstellung der linearen 12% Polyacrylamidgele der zweiten Dimension kam eine Protean™ II Multi-Gel Gießkammer für 10 Gele zu 2mm Stärke, zur Anwendung.

Tabelle 3.4

Acrylamid	84g
Bis	2,24g
1,002M Tris Puffer	117ml
0,6M HCl	117ml

Der Ansatz wird mit aqua. dest. auf 700 ml aufgefüllt und eine halbe Stunde lang mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast.

Kurz vor dem Gießvorgang werden zugesetzt

TEMED	350µl
SDS(4%)	17,5ml
APS(40%)	350µl

Arbeitsprotokoll zum Gießen von zehn Gelen für die zweite Dimension

Nach dem Gießvorgang wurden die Gele mit wassergesättigten Butanol überschichtet und während eines Zeitraumes von 12 Stunden bei Zimmertemperatur auspolymerisiert.

3.2.1.6 Starten der Elektrophorese der zweiten Dimension

Die Gelstreifen der ersten Dimension wurden in 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 0,15 M Bis/Tris-Buffer, 0,1 M HCl, 2,5% SDS und 10 mM DTT zweimal für je 10 Minuten äquillibriert und anschließend an die freie Kante der Gele der zweiten Dimension angelegt.

Für die nahtlose Verbindung der Gele sorgte eine erhitzte Versiegelungslösung, bestehend aus 1% Agarose, 0,2% SDS, 0,15 M Bis/Tris-Puffer und 0,1 M HCl. Zur Kenntlichmachung der Proteinlauffront in der Elektrophorese wurde der Versiegelungslösung als Marker etwas Bromphenolblau zugesetzt. Nach dem Erkalten der Lösung konnten die Gele in den Dalt Tank eingesetzt werden. Für die Anode kam ein auf 4°C gekühlter Standard Laemmli Puffer für SDS-PAGE zur Anwendung; der Kathoden-Puffer enthielt 0,1 M Tris, 0,1 M Taurine und 0,1% SDS. Der Ansatz für einen zehnfach konzentrierten Anodenpuffer bestand aus 0,1% SDS, 14,4% Glycin und 3% Tris. Die Elektrophorese wurde bei 4° C über eine Stunde mit konstant 25 V und dann bis zum Erreichen des Gelendes mit 40mA/Gel durchgeführt.

Hatte die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht, konnten die Gele in 50% Ethanol und 2% Phosphorsäure für 12 Stunden fixiert werden.

3.2.1.7 Färben der Gele

Nach gründlichem Waschen in destilliertem Wasser, sind die Gele nach Neuhoff in 17% Ammoniumsulfat, 3% Phosphorsäure, 34% Methanol für eine Stunde inkubiert und anschließend dazu 1g Coomassie Blue, das zuvor in 250 ml Neuhoff-Lösung solubilisiert und abfiltriert wurde, gegeben worden (Neuhoff 1988). Nach drei Tagen im Färbebad konnte überschüssiges Coomassie Blau mit destilliertem Wasser ausgewaschen werden.

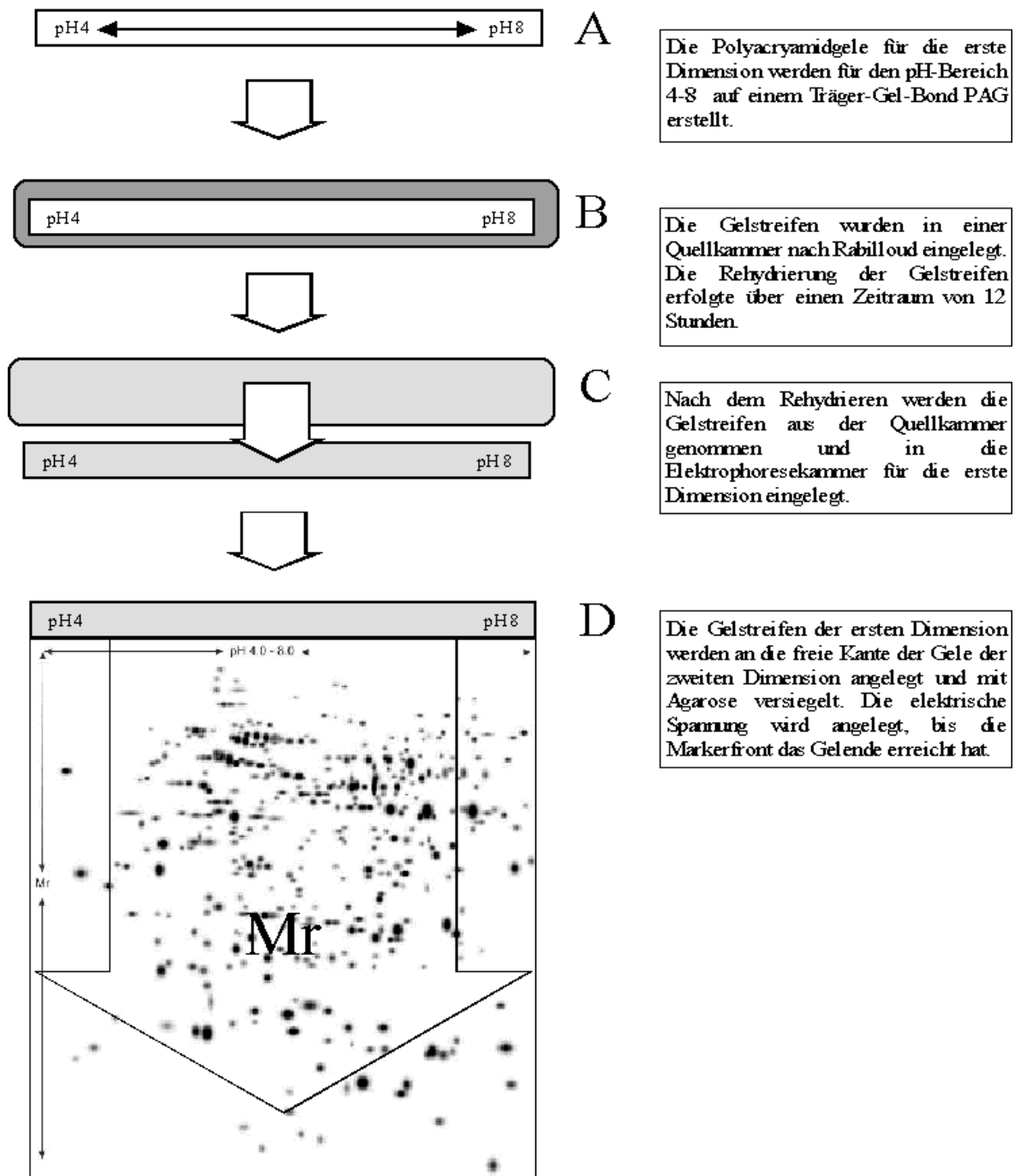


Abbildung 3.2.1

Schematische Darstellung der Arbeitsschritte 3.2.1.2 bis 3.2.1.6 im Text.

3.2.2 Auswertung der Gele mit PDQUEST™

Nach dreitägigem Färbebad und einem weiteren Tag in Aqua destillata zur Ausdiffusion von überschüssigem Coomassie Blue, konnten die Gele der zweiten

Dimension der rechnergestützten Auswertung zugeführt werden. Zur Anwendung kam das PDQUEST™-System von **pdi**, welches weltweit auch in zahlreichen anderen Arbeitsgruppen größere Verbreitung gefunden hat (Garrels 1989; Blose 1985)

Als Arbeitsplattform diente eine Sun SPARC Workstation und in der Peripherie ein DeskTop™ Scanner. Unter Solaris 2.1 mit OpenWindows™ als graphische Benutzeroberfläche, wurden mit PDQUEST™ alle weiteren Operationen vorgenommen.

3.2.2.1 Einscannen der Gele

Für die Grauwertkalibration des Scanners diente ein Kodak Step Tablet No. 312ST114 im roten Wellenlängenbereich.

Der eigentlichen Scanvorgang wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1.) Es wurde der für die Coomassie Blue vorgesehene Wellenlängenbereich des Rotlichtes gewählt.
- 2.) Die optische Dichte als der dekadische Logarithmus des Quotienten von abgegebener zur aufgenommenen Lichtintensität wurde auf Werte von 0.0 bis 2.0 eingestellt.
- 3.) Die Pixelgröße betrug $127 \times 127 \mu\text{m}$.

3.2.2.2 Proteinspot Erkennung

PDQUEST™ bietet ein Verfahren zur automatischen Erkennung der angefärbten Proteinspots an, das sich zum Teil benutzerdefiniert einrichten läßt. Für die Gele der zweiten Dimension wurden folgende Optionen genutzt:

1.) Arbeitsschritt: Averaging Smooth

Eine Prozedur in der Störungen des Hintergrundes und nicht fokussiertes Protein entfernt werden.

2.) Arbeitsschritt: Remove Background

Ein von **pdi** entwickeltes Verfahren, um den schwach gefärbten Hintergrund von den eigentlichen Spots abzuziehen. Dabei wird das Gel in vertikalen Säulen durch eine rotierende Scheibe abgetastet. Es ergibt sich eine Dichtemessung mit Maximal- und Minimalwerten. Verbindet man die Basis aller Maximalwerte zu einem Graphen, werden alle Werte unterhalb des Graphen als Hintergrund definiert und rechnerisch subtrahiert (Abb. 3.2.1). Der Radius der Meßscheibe läßt sich den individuellen Verhältnissen der Gele anpassen. Ein sehr klein gewählter Radius entfernt den Hintergrund sehr zuverlässig, allerdings mit der Gefahr sehr schwach gefärbte Spots ebenfalls zu eliminieren. Ein großer Radius bereitet bei der späteren Auswertung Probleme, da der Hintergrund nur ungenügend entfernt wird (Abb. 3.2.2).

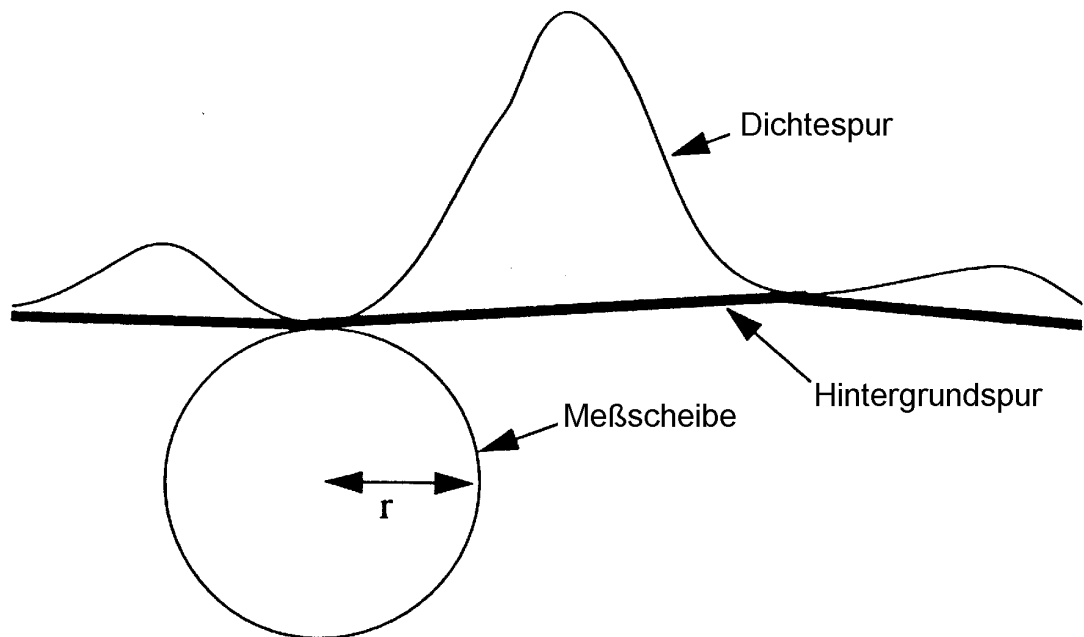


Abbildung 3.2

Die Meßscheibe verbindet die Basen der Dichtespur zu einer Hintergrundspur unter der alle optischen Dichten subtrahiert werden (Mod. n. PDQUEST™ Users's Guide).

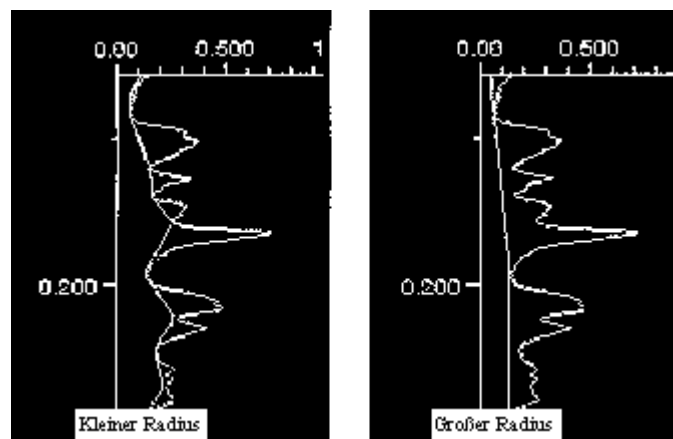


Abbildung 3.3

Je nach Größe des abtastenden Radius der Meßscheibe erhält man ein unterschiedliches Gelimage. Die Optimierung des Radius ist für die optimale Auswertung der Gele von entscheidender Bedeutung (Mod. n. PDQUEST™ Users's Guide).

3.) Arbeitsschritt: Processing the Gel Image

Im nächsten Arbeitsschritt wird ein Abbild des überarbeiteten Scans erstellt. In diesem sogenannten Gel Image werden ab jetzt alle weiteren Operationen

durchgeführt.

4.) Arbeitsschritt: Detect Spots

Für jede Quantität oberhalb des rechnerisch subtrahierten Hintergrundes wird ein Mittelpunkt bestimmt und dieser dann als Spot definiert.

5.) Arbeitsschritt: Fit all Spots

Für jeden Spot werden x- und y-Koordinaten bestimmt und gemäß dem Normalverteilermodell nach Gauß die assoziierten Parameter x-sigma und y-sigma sowie Höhe bestimmt und als Spotinformation abgespeichert.

Der oben beschriebene Vorgang vermag einen großen Anteil Proteinspots automatisch zu erkennen. Trotzdem muß in jedem Fall manuell nachgearbeitet werden. Artefakte auf dem Gel, nicht vollständig entfernte horizontale und vertikale Streifen, sehr dicht beieinander liegende oder sehr große Spots werden häufig nicht richtig eingeordnet bzw. nicht erkannt. Von der Gesamtzahl erkannter Spots müssen noch ca. 15 bis 20 % als falsch bzw. doppelt gesetzt abgezogen werden. Ca. 3-5% werden nicht als Spot erkannt und müssen manuell gesetzt und eingepaßt werden, bzw. bei etwa 2% mußte nur die Einpassung nach Gauß -bei falsch eingesetzter Spotmitte- wiederholt werden.

3.2.2.3 Erstellen eines Matchsets

Anschließend wird aus den drei Läufen der zweiten Dimension ein virtuelles Standardgel erstellt, daß die Informationen aller drei Gele enthält. Dies wird für alle Zelllinien der Ausgangs- und der resistenten Reihe gleichermaßen

durchgeführt. Nur auf der Ebene der jeweiligen Standard-Gele lassen sich mit PDQUEST™ die Auswertungsfunktion nutzen.

Die Vorgehensweise ist wie folgt:

Von einem der drei Gel Images wird eine Kopie erstellt, die die Information des ursprünglichen Gel Images und das der beiden anderen in sich vereint. Das Standard Gel Image dient dazu, Änderungen für alle Gele vorzunehmen und vergleichende Informationen abzurufen. Die Zusammenfassung der drei Gele in den Standard ist der Versuch, alle drei Läufe zur Deckung zu bringen. Zunächst wählt man einige charakteristische Spots aus, die man gleichsam auf dem Standard wie auf den Gel Images markiert. PDQUEST nutzt diese sog. Landmarks als Fixpunkte und mit der Aufforderung „Match all Gels to Standard“ können weiter unmarkierte Spots zur Deckung gebracht werden. Der Vorgang aus Landmark setzen und matchen wird solange wiederholt, bis alle matchfähigen Spots ihre Entsprechung im Standard finden. Den erkannten Spots werden automatisch übereinstimmende Nummern zugewiesen.

Das Endprodukt ist ein sog. „lower level matchset“, dessen Standard die Informationen dreier Gele einer Zellinie enthält. Um zwei Zellinien miteinander zu vergleichen, müssen die Spot-Quantitäten normalisiert werden und ein „higher level matchset“ erstellt werden. Normalisierung bedeutet, dass die Quantität eines einzelnen Spots dividiert wird, durch die Quantität aller auf dem Gel enthaltenen. Die Ausgabe des Wertes erfolgt in parts per million; somit lassen sich Gele untereinander quantitativ vergleichen. Das „higher level matchset“ setzt sich aus zwei oder mehr „lower level matchsets“ zusammen. Auch hier wird ein Standard Image erstellt. Der Matchvorgang kann aber direkt in den Standard Images erfolgen.

Für die Kontrolle der Qualität von 2-D-Elektrophorese und dem Match-Vorgang stehen mehrere Hilfsmittel zu Verfügung:

- 1.) Nach Normalisierung und Matchen, bietet PDQUEST™ die Möglichkeit, die Quantitäten eines Gels (Abszisse) gegen die eines anderen Gels (Ordinate)

aufzutragen und den Korrelationskoeffizienten zu berechnen (vgl. Abb. 5.1.1).

2.) Es existieren weiterhin mehrere Menüs, die es ermöglichen, nicht markierte oder nur teilweise in das Matchset aufgenommene Spots herauszufiltern, um gezielt etwaige Fehlzuordnungen zu erkennen und zu beheben.

3.) PDQUEST™ bietet die Möglichkeit, sich die Abweichungsvektoren aller Spotpositionen in einem Matchset im einzelnen Gel sichtbar zu machen. 2-D-Gele sind nie völlig deckungsgleich. Abweichungen ergeben sich aus Inhomogenitäten während des Gießvorganges in der zweiten Dimension, minimale Laufzeitänderungen oder Störungen in der Elektrophorese und schließlich durch divergierender Wahl des Ausschnitts beim Scannvorgang. Die Richtung und die Größe der Abweichung läßt sich im Verhältnis zum Standardgel, dessen Spots als relativer Fixpunkt dienen, graphisch darstellen. Die Aussagekraft der Offsets besteht darin, die während des Matchvorgangs falsch zugeordneten Spots sichtbar zu machen. Die Abweichungsvektoren sind regional immer gleich ausgerichtet, überkreuzen sie sich aber, so deutet dies auf einen Fehler in der Spotzuordnung hin (vgl. Abb. 3.2.3).

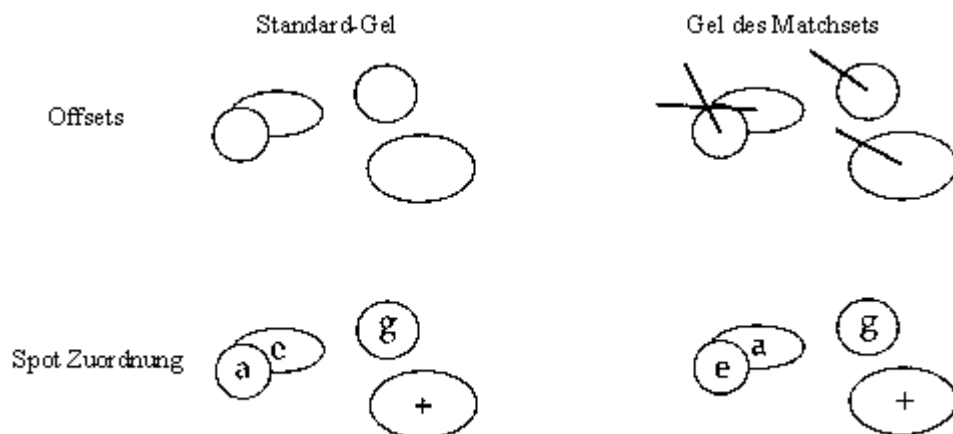


Abbildung 3.3

In einem Gel des Matchsets ist die Spotzuordnung zum Standard falsch erfolgt. Um in einer unübersichtlichen Menge an Spots dieses zu erkennen, lassen sich die

Abweichungsvektoren relativ zu den Spots des Standards als Offsets darstellen. Eine Überkreuzung der Abweichungsvektoren deutet auf eine Fehlzuordnung hin (Mod. n. PDQUEST™ Users's Guide).

Sind die Matchsets der einzelnen Zelllinien erstellt, bietet PDQUEST™ mehrere Verfahren zur Datenanalyse, die je nach Fragestellung zur Anwendung kommen.

1.) Auswertungsmenü: Qualitative User Analysis Set

Hier können ON/OFF-Phänomene selektiv dargestellt werden. Anders als bei der Darstellung nicht gematchter Spots, werden hier korrespondierend Spotpaare verglichen. Der Faktor, um welchen sich die Quantitäten unterscheiden sollen, ist frei wählbar.

2.) Auswertungsmenü: Quantitative User Analysis Set

Es werden entweder zwei unterschiedliche Gele oder definierbare Gelgruppen nach quantitativen Gesichtspunkten untersucht. Der Multiplikator ist von 0.01 bis 10.00 frei wählbar.

3.) Auswertungsmenü: Boolean User Analysis Set

Zwei unter 1.) und 2.) erstellte Sets können mit diesem Menü verknüpft werden. Zur Darstellung können dann die Spots kommen, die in beiden insgesamt, in beiden gemeinsam oder nicht in beiden gemeinsam vorhanden sind.

4.) Auswertungsmenü: Statistic User Analysis Set

Die Analyseverfahren unter 1.) bis 3.) betrachten immer das Einzelgel im Vergleich zu einem anderen, auch wenn man mehrere Gele zu einer Gruppe zusammengefaßt hat. Um der Relevanz einer Quantitätsänderung in einer Gruppe von Gelen beurteilen zu können, steht Student's T-Test bzw. ein Man-Whitney-Test zur Verfügung. Das Konfidenzintervall läßt sich festlegen. Für alle durchgeführten Analysen wurde der Student's T-Test benutzt, wobei für $p \leq 0,05$ gesetzt war.

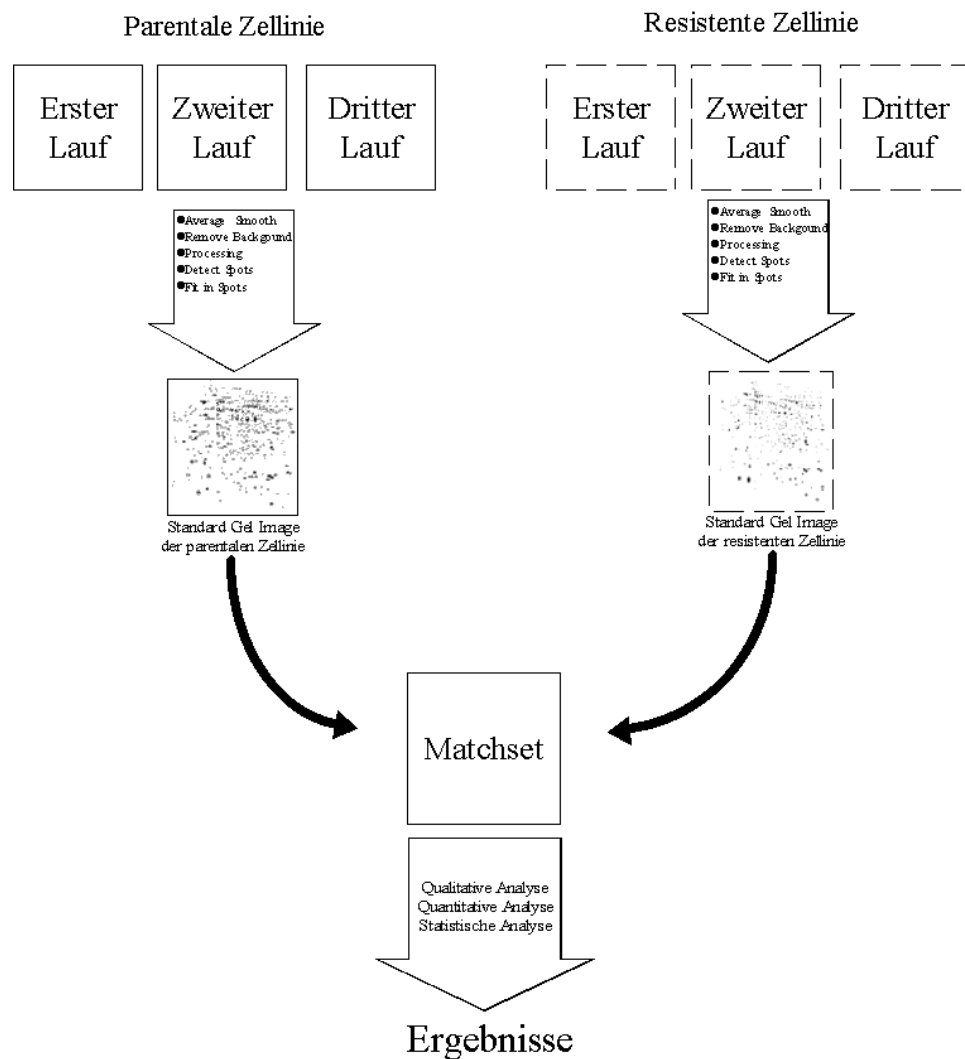


Abbildung 3.4

Übersicht der Arbeitsschritte im PDQUEST-System. Ausgehend von einer Charge von drei Gelen der zweiten Dimension für die parentale und die ein oder zwei Chargen der resistenten Zelllinien, stehen am Ende die Ergebnisse zu den Fragen der ON/OFF Phänomene bzw. der Hoch-/Herabregulation einzelner Proteine.

3.2.3 Sequenzierung der in der zweidimensionalen Elektrophorese ermittelten Proteine

Die Proteinspots in den präparativen Läufen der zweidimensionalen Elektrophorese wurden direkt aus dem Gel ausgeschnitten. Die anschließende Auslösung aus dem Gel, enzymatische Hydrolyse, Massenspektrophotographie

und nachfolgende Sequenzierung mit Micropore-HPLC wurden von der WITA GmbH (Deutschland) durchgeführt (Übersicht in Jungblut 1996)

4 Ergebnisse

4.1 Magenkarzinom

Das Standardmatchset der parentalen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257P enthielt 393 Proteinpunkte (Abb. 4.1.1), die resistenten Zelllinien EPG85-257RNOV 221 (Abb. 4.1.2) und EPG85-257RDB 281 Spots (Abb. 4.1.3). Von diesen konnten bei der mit Mitoxantron selektierten 189 (85%) und bei der mit Daunorubicin selektierten Zelllinie 231 (82%) dem parentalen Standard zugeordnet werden. Neu in EPG85-257RNOV aufgetreten waren acht Proteinspots und in EPG85-257RDB drei Proteinspots, wobei der Spot 4302 sowohl in EPG85-257RDB, als auch in EPG85-257RNOV zu finden war.

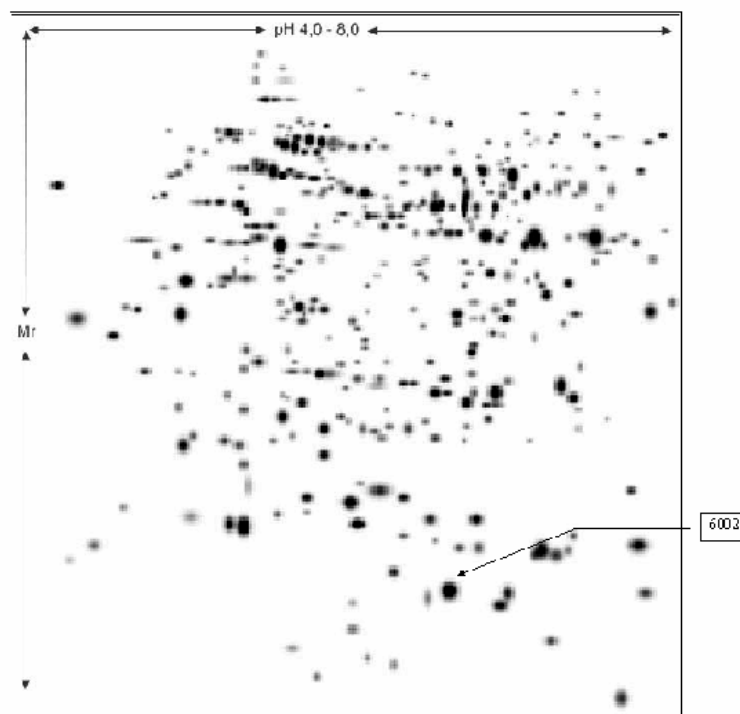


Abbildung 4.1.1

Standardimage der parentalen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257P.

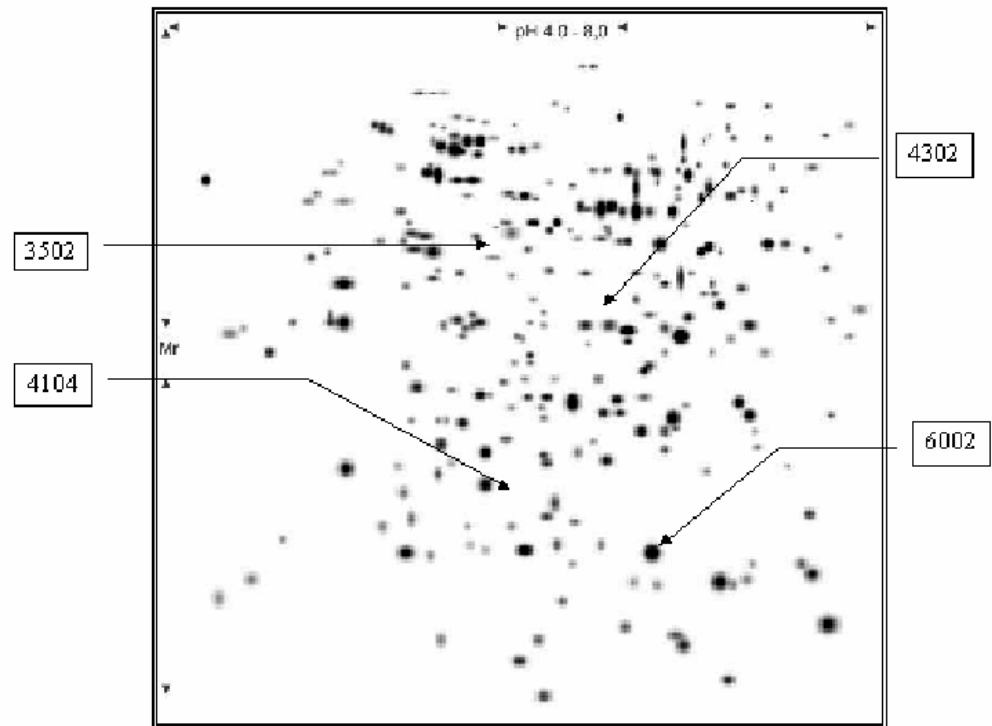


Abbildung 4.1.2

Standardimage der mit Daunorubicin selektierten Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB.

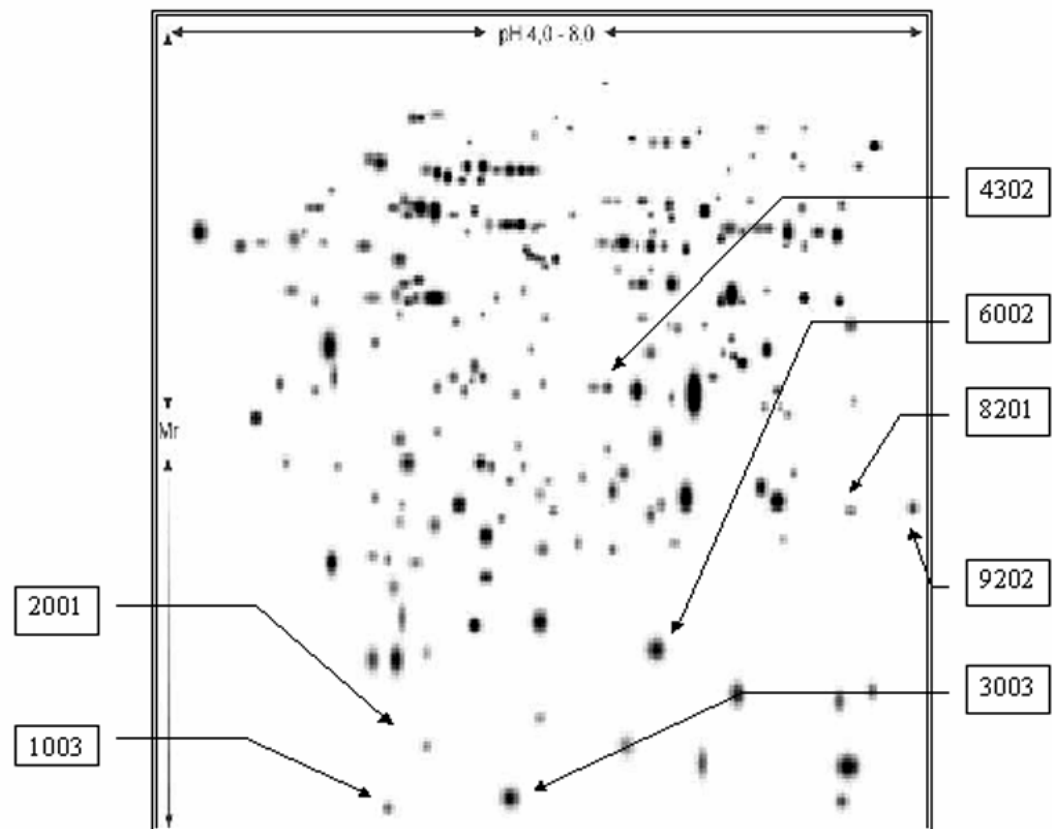


Abbildung 4.1.3

*Standardimage der mit Mitoxantron selektierten
Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV.*

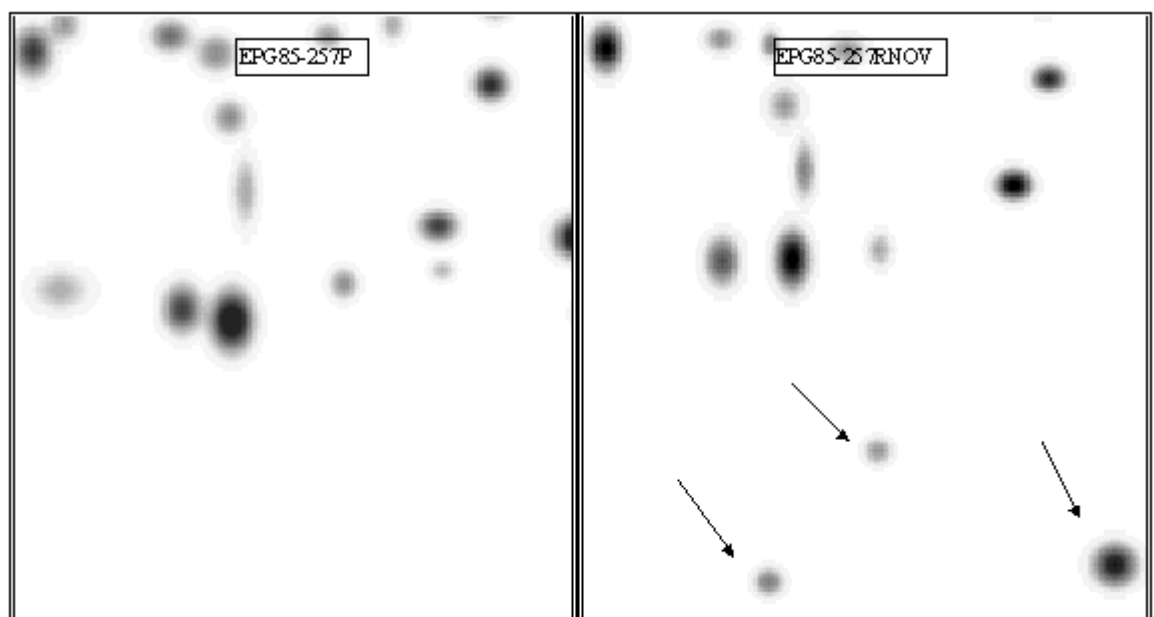


Abbildung 4.1.4

Detailansicht mit den nichtmatchbaren Spots 1003, 2001 und 3003 in EPG85-257RNOV. Spot 1003 stellt sich in der Sequenzierung als Thioredoxin dar. Für Spot 3003 konnten zwei Sequenzen ermittelt werden, die aber keinem bekannten Protein zuordnenbar sind. Spot 2001 konnte nicht sequenziert werden.

Für das Protein 1003 (Abb. 4.1.4) konnte die Sequenz Thr-Ala-Phe-Gln-Glu-Ala-Leu-Asp-Ala-Ala-Gly-Asp-Lys ermittelt und damit eindeutig als Thioredoxin (TRX) identifiziert werden.

Dagegen konnten bei Spot 3003 (Abb. 6) zwei Sequenzen ermittelt werden; allerdings blieb eine Datenbankrecherche nach einer bekannten korrespondierenden Sequenz erfolglos. Das beste Match fand sich mit 69,8% Aminosäurenübereinstimmung für ADP-Ribosylationsfaktor-1, einem Protein aus der Familie der GTP-bindenden Proteine, die am intrazellulären Proteintransport im Zusammenhang mit dem Golgi Apparat beteiligt sind.

Bei der nur geringen Übereinstimmung von knapp 70% zu ADP-Ribosylationsfaktor 1 ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei Protein 3003 um ein bislang unbekanntes Protein handelt.

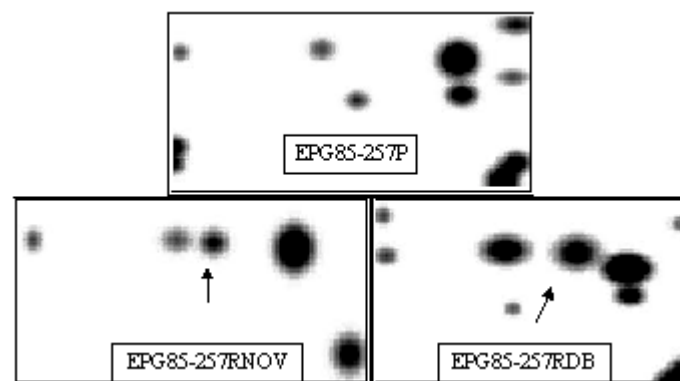


Abbildung 4.1.5

Detailansicht von Spot 4302, der sich sowohl in der gegen Mitoxantron als auch Daunorubicin resistenten Zelllinie nachweisen ließ. Die Sequenzierung ergab, daß es sich hierbei um Annexin-1 handelt.

Für Proteinspot 4302 (Abb. 4.1.5) konnte die Sequenz Asp-Leu-Glu-Leu-Lys ermittelt werden; mit den Daten aus der Massenspektrographie ergab sich ein

eindeutiges Match mit Annexin-1 (A1).

A1 hemmt durch Inhibition der Autophosphorylation die Insulinrezeptor Protein-Tyrosin-Kinase (Melki 1994).

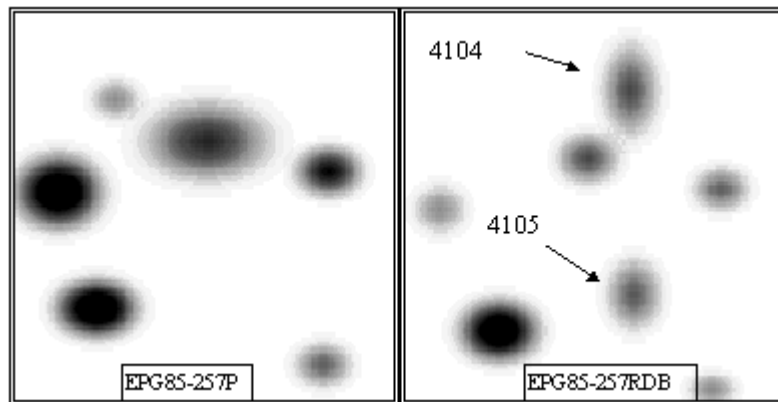


Abbildung 4.1.6

Detailansicht der Spots 4104 und 4105, die sich nur in der mit Daunorubicin selektierten Magenkarzinomzelllinie fanden.

Die Spots 4104 und 4105 (Abb. 4.1.6) wurden auf Grund von Überlagerungen benachbarter Proteinpunkte in der präparativen zweidimensionalen Elektrophorese verdeckt und konnten damit einer Sequenzierung nicht zugeführt werden.

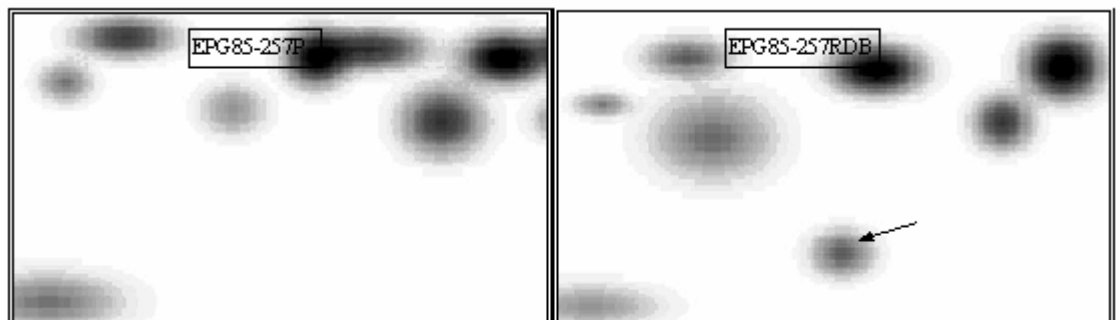


Abbildung 4.1.7

Detailansicht des Proteinspots 3502 in der mit Daunorubicin selektierten Magenkarzinomzelllinie.

Auch Spot 3502 (Abb. 4.1.7) war in der präparativen zweidimensionalen Elektrophorese nicht mehr zu reidentifizieren.

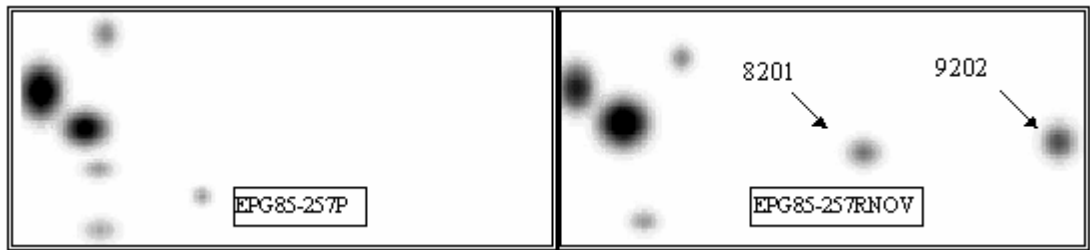


Abbildung 4.1.8

Detailansicht der Spots 8201 und 9202, die sich nur in der mit Mitoxantron selektierten Magenkarzinomzelllinie fanden.

Für die Spots 8201 und 9202 (Abb. 4.1.8) wurden nach Spaltung mit LysC und Trennung der Peptide per Mikro-HPLC Sequenzierungsversuche unternommen, die aber ohne Erfolg blieben.

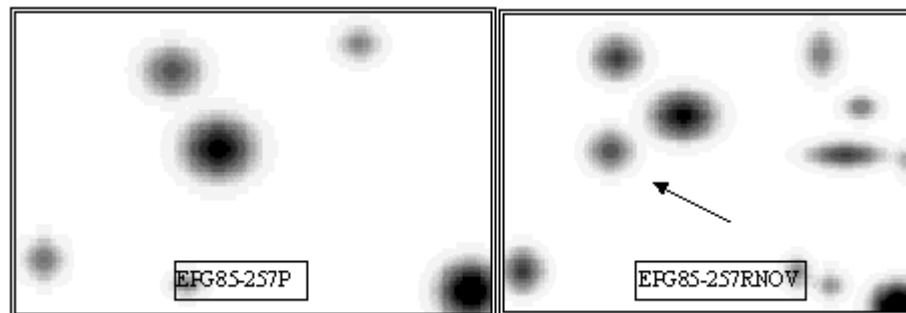


Abbildung 4.1.9

Detailansicht von Spot 1205, der sich nur in der mit Mitoxantron selektierten Magenkarzinomzelllinie fand.

Auf Grund von Mengenproblemen konnte für den Spot 1205 (Abb. 4.1.9) nach Spaltung mit LysC keine Peptidsequenz erstellt werden.

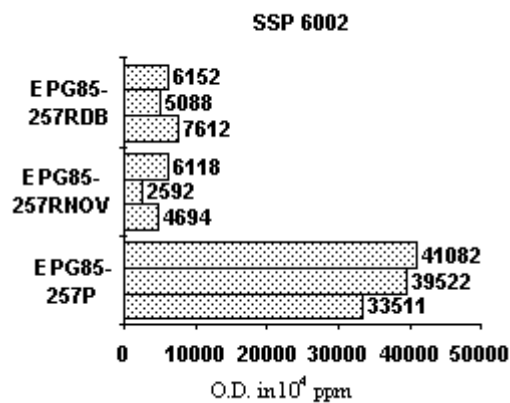


Abbildung 4.1.10

Proteinspot 6002, der sich sowohl in der mit Mitoxantron als auch mit Daunorubicin selektierten Magenkarzinomzelllinie fand, zeigt in der parental eine deutlich höhere Expression als in den resistenten Zelllinien.

4.2 Kolonkarzinom

Nach der zweidimensionalen Elektrophorese mit den Zelllinien HT29P, HT29RNOV und HT29RDB konnten für jede Zelllinie Standard Images erstellt werden, von denen das der parental Kolonkarzinomlinie 393 Proteinspots (Abb. 4.2.1), das der mit Mitoxantron selektierten 221 (Abb. 4.2.2) und das der Daunorubicin selektierten 281 enthält (Abb. 4.2.3). Nach Erstellung des Matchsets konnten der parental Linie 231 (82%) von HT29RDB und 189 (85%) Spots von HT29RNOV zugeordnet werden. Die Spots 3201 und 405 fanden sich nur in der mit Mitoxantron selektierten, wogegen die Spots 105, 9802, 8204, 8101 und 8204 sich nur in der mit Daunorubicin selektierten Zelllinie nachweisen ließen. Es fanden sich fernerhin zahlreiche Proteinspots in beiden resistenten Zelllinien, die eine vermehrte bzw. verminderte optische Dichte zeigten, ohne jedoch eine deutliche Signifikanz zu zeigen.

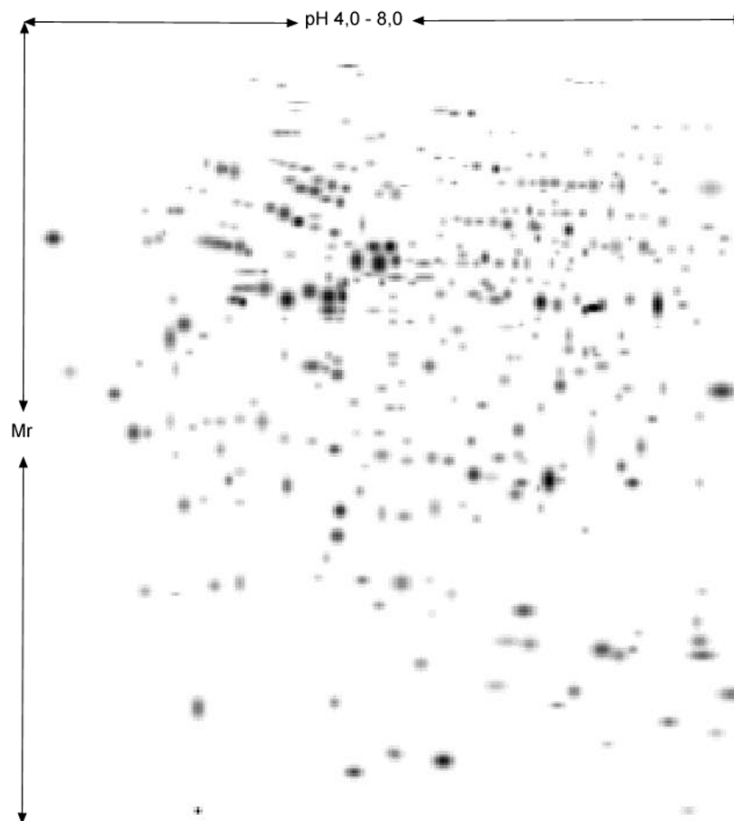


Abbildung 4.2.1

Standard Image der parentalen Kolonkarzinom Zelllinie HT29P.

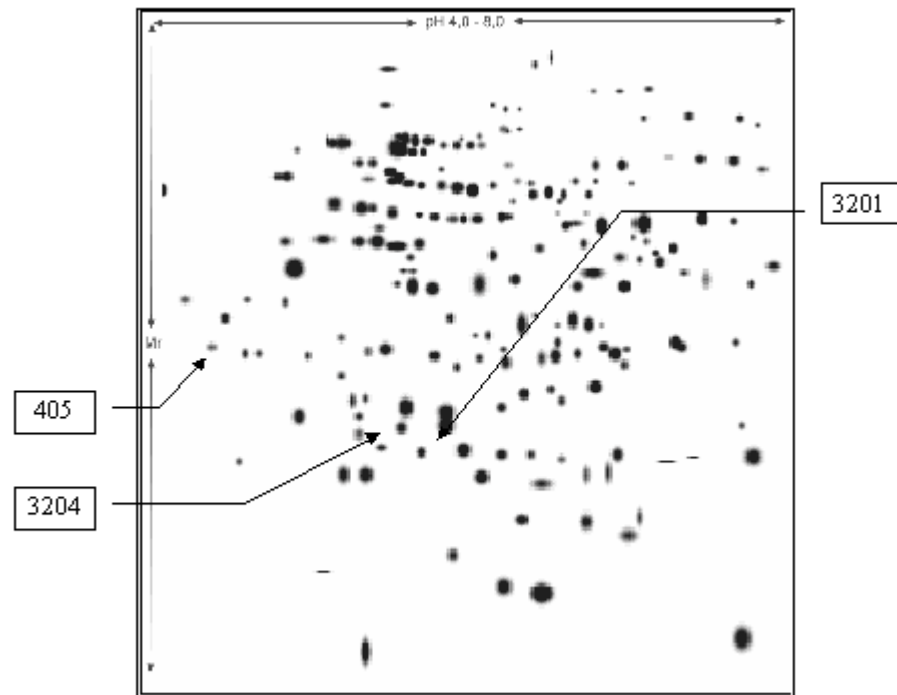


Abbildung 4.2.2

*Standard Image der mit Mitoxantron
selektierten Kolonkarzinom Zelllinie
HT29RNOV.*

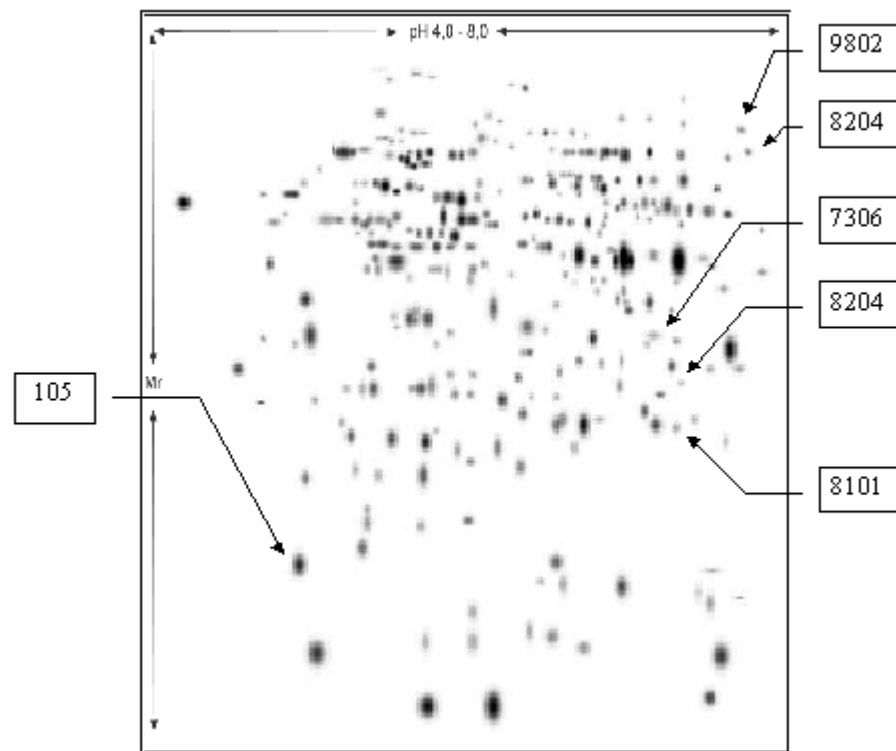


Abbildung 4.2.3

*Standard Image der mit Daunorubicin
selektierten Kolonkarzinom Zelllinie
HT29RDB.*

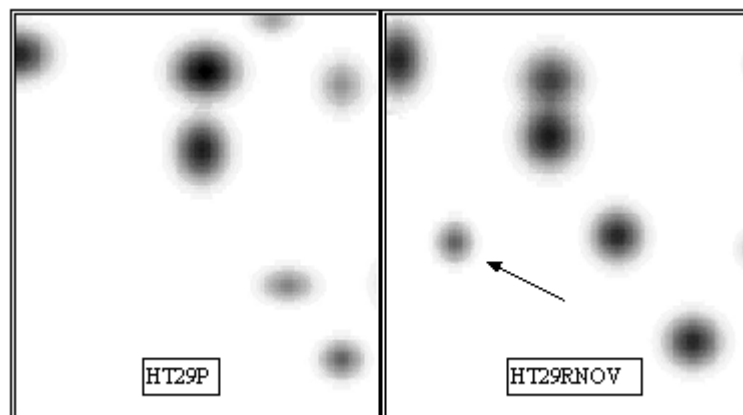


Abbildung 4.2.4

*Detailausschnitt mit dem nicht in der parentalen
Zelllinie vorhanden Spot 3201 (Adenin-
Phosphoribosyltransferase).*

Nach interner Spaltung mit Trypsin konnten in der HPLC für den Spot 3201 (Abb. 4.2.4) fünf Massen im Reflectron nachgewiesen werden. Die Sequenz ergab Ala-Ala-Ile-Gly-Leu-Leu Ala-Arg; die Interpretation war eindeutig: Es handelt sich um Adenin-Phosphoribosyltransferase.

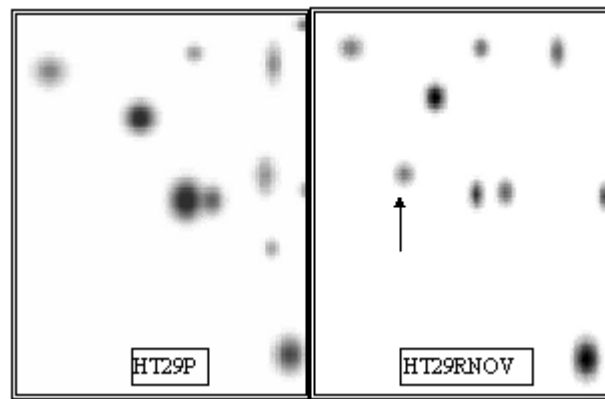


Abbildung 4.2.5

Detailausschnitt mit dem nicht in der parentalen Zelllinie vorhanden Spot 405. Ein Sequenzierungsversuch wurde nicht unternommen.

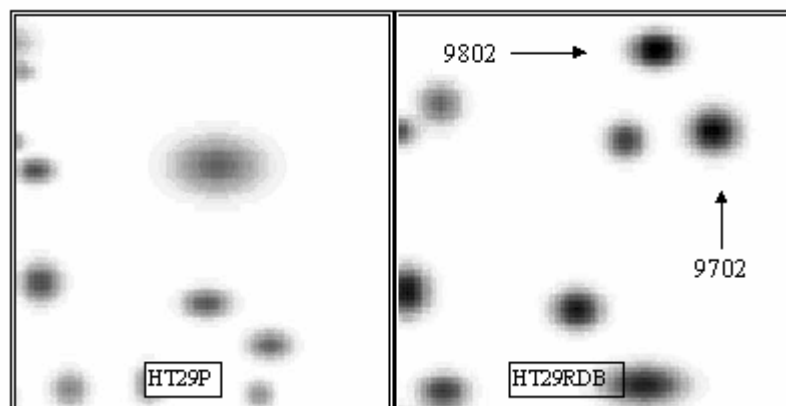


Abbildung 4.2.6

Detailausschnitt mit dem nicht in der parentalen Zelllinie vorhanden Spots 9802/9702.

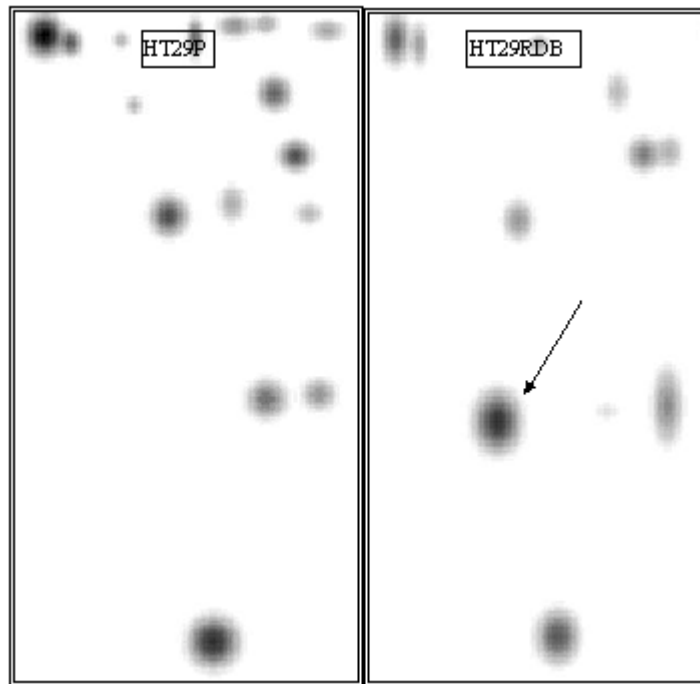


Abbildung 4.2.7

Detailausschnitt mit dem nicht in der parentalen Zelllinie vorhanden Spot 105 für den in der Sequenzierung eine enge Homologie zu BCSG-1 nachgewiesen werden konnte.

Für den Spot 105 (Abb. 4.2.7) fanden sich nach interner Spaltung mit Trypsin in der HPLC 3 bis 5 Massen im Refectormode. Die Zuordnung war nicht eindeutig möglich. Es konnten zwei Sequenzen ermittelt werden:

- 1.) Glu-Gly-Val-Val-Gly-Ala-Val-Glu-Lys mit acht Aminosäuren Homologie zu humanen BCSG-1.
- 2.) Gly-Phe-Ser-Ile-Ala-Lys mit sechs Aminosäuren Homologie zu humanen BCSG-1.

Da es zu BCSG-1 kein 100% Match gab, liegt die Vermutung nahe, daß es sich um ein eng verwandtes, noch nicht vorbeschriebenes und daher unbekanntes Protein handelt.

In der präparativen zweidimensionalen Elektrophorese konnte nur der Spot 9802 (Abb. 4.2.6) zur Sequenzierung dargestellt werden. Für diesen fanden sich nach interner Spaltung mit LysC keine Spitzen im Massenfingeraabdruck: Eine Identifizierung von Spot 9802 war damit nicht möglich.

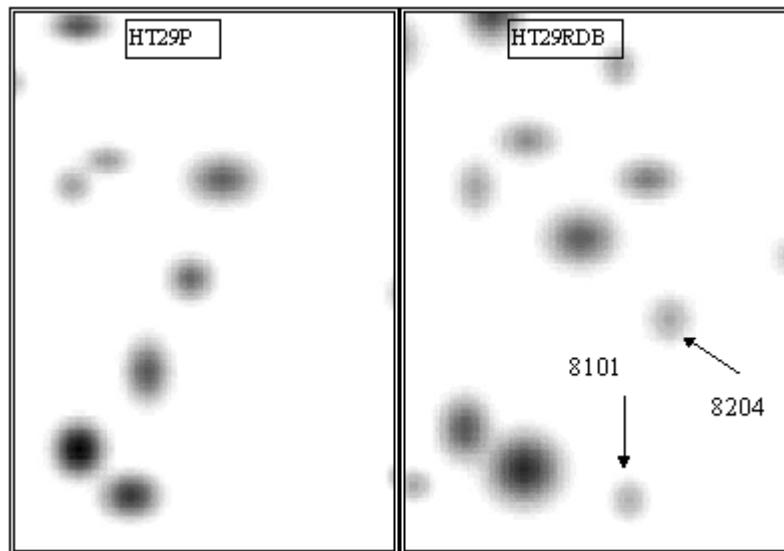


Abbildung 4.2.8

Detailausschnitt mit dem nicht in der parentalen Zelllinie vorhanden Spots 8101/8204.

Die beiden Spots 8101/8204 (Abb. 4.2.8) konnten im präparativen Lauf auf Grund von Überlagerungen benachbarter Proteine nicht mehr reidentifiziert werden. Ein Sequenzierungsversuch wurde nicht unternommen.

4.3 Pankreaskarzinom

Der Standard der Ausgangszelllinie vom Pankreaskarzinom enthielt 499 Proteinspots (Abb. 4.3.1), der Zelllinie EPP85-181RNOV 316 (Abb. 4.3.2) bzw. 164 für EPP85-181RDB.

198 (63%) Proteinspots der mit Mitoxantron selektierten Zelllinie ließen sich dem Standard zuordnen, dagegen nur 117 (71%) für EPP85-181RDB. Auf Grund des schlechten Matchergebnisses ist es auch zu erklären, daß für diese Zelllinie kein eindeutiger Hinweis auf eine klare Hochregulation eines Proteines zu finden war.

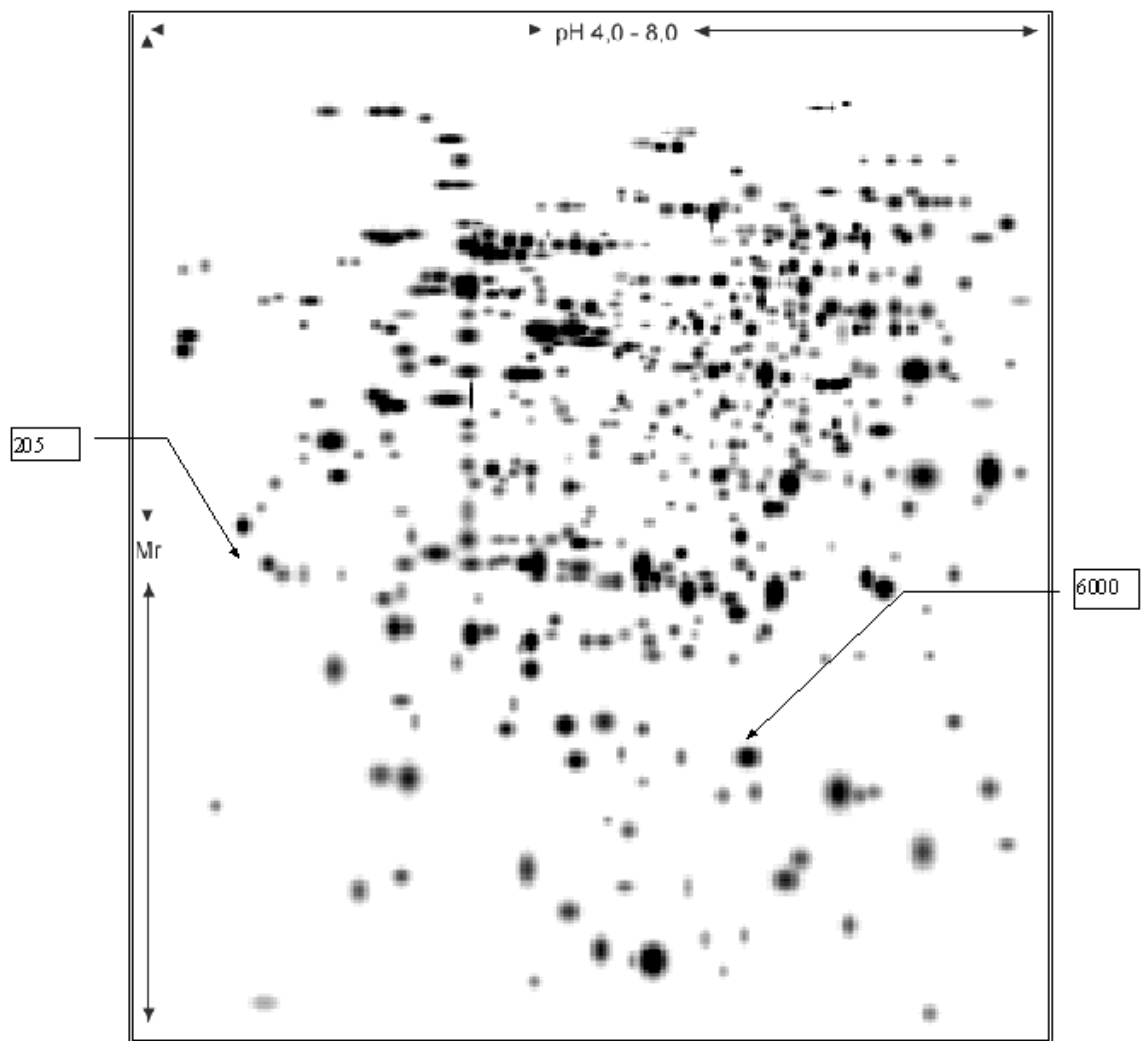


Abbildung 4.3.1

Standardimage der parentalen Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181P.

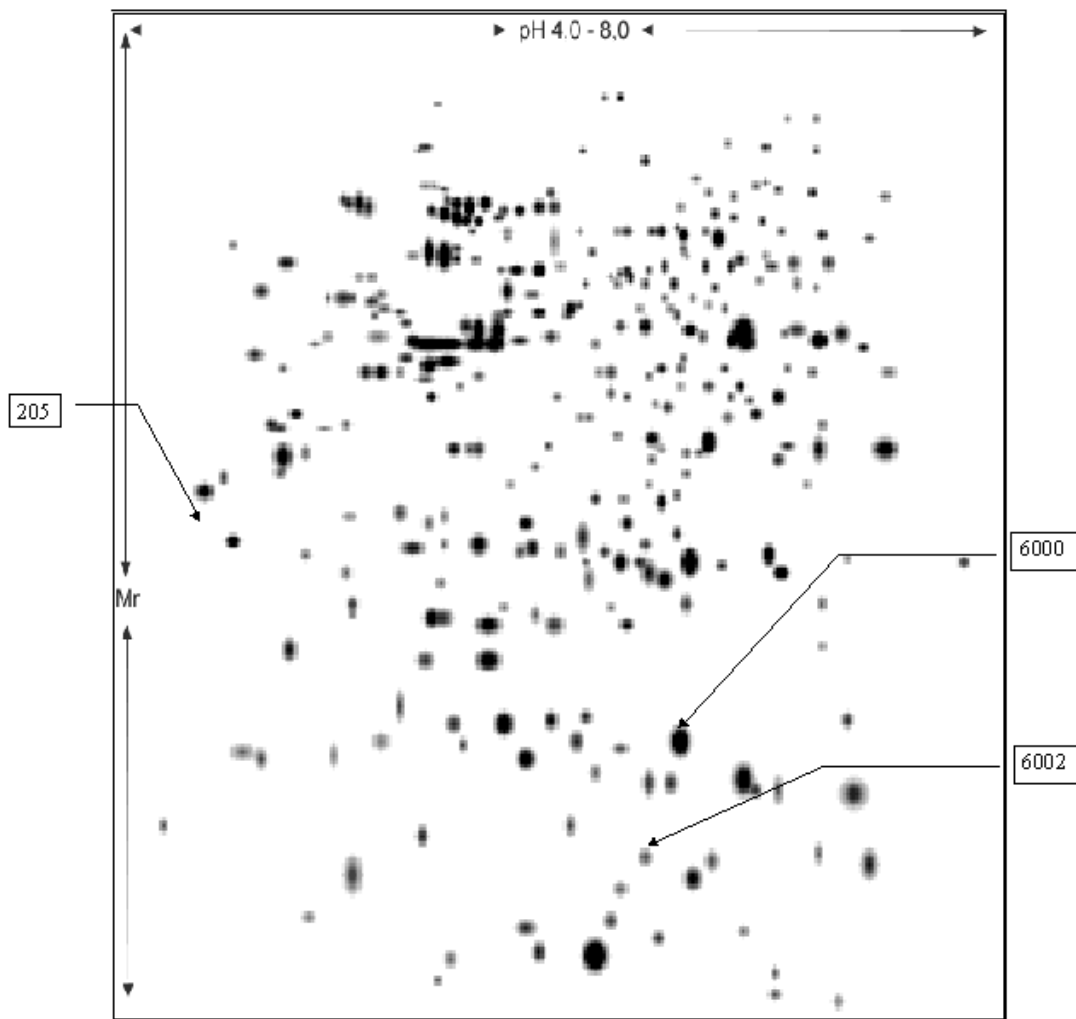


Abbildung 4.3.2

Standardimage der mitoxantronselektierten Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RNOV.

Für die EPP85-181RNOV Zelllinie konnten 19 Hinweise für eine Hochregulation um mehr als das zweifache gefunden werden, von denen aber nur bei zweien eine Signifikanz bestand (Spots 205 und 6000). Proteinspot 6000 zeigte allerdings auch in der daunorubicinresistenten Zelllinie einen vermehrtes Vorkommen. Klar und gut abgrenzbar war der Spot 6002 in EPP85-181RNOV. Für die Sequenzierung konnten alle drei vorgenannten Spots im präparativen Lauf erkannt und isoliert werden.

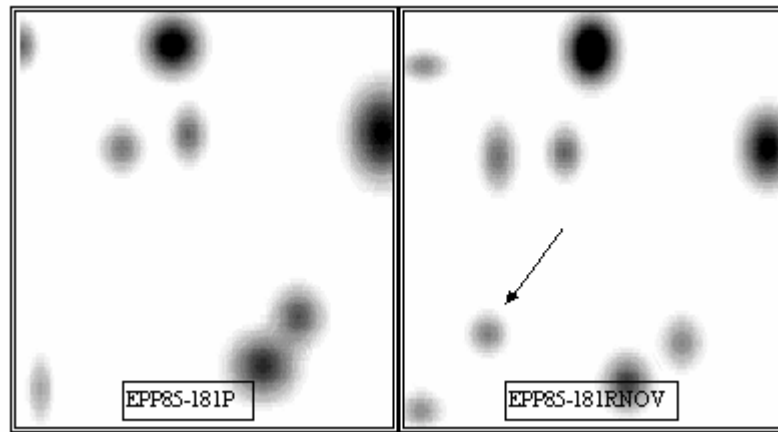


Abbildung 4.3.3

Detailansicht vom Proteinspot 6002 der sich nur in der mit Mitoxantron selektierten Pankreaskarzinomzelllinie fand.

Die Sequenzierung von 6002 (Abb. 4.3.3) ergab die Aminosäurenabfolge Glu-Leu-Gly-Val-Gly-Ile-Ala-Leu-Arg und konnte damit als fettsäurebindendes Protein (FABP) identifiziert werden.

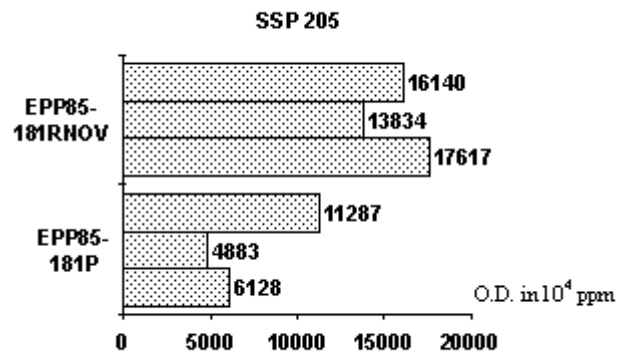


Abbildung 4.3.4

Proteinspot 205 fand sich in der mit Mitoxantron selektierten Pankreaskarzinomzelllinie signifikant vermehrt im Gegensatz zur parentalen Zelllinie. Die Sequenzierung zeigte, daß es sich um Stratifin handelt.

Für Spot 205 (vgl. Abb. 4.3.1 u. 4.3.2) fand sich in der mitoxantronresistenten Zelllinie eine Erhöhung der optischen Dichte um mehr als das Doppelte (Abb. 4.3.4). Die Sequenz für Spot 205 war klar detektierbar und bestand aus Gly-Asp-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Leu-Ala-Glu-Val-Ala-Thr. Sie ergibt ein 100% Match zu Stratifin.

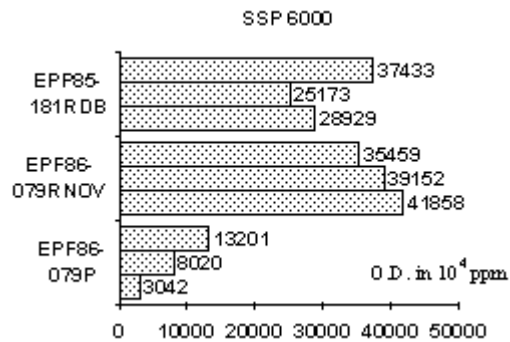


Abbildung 4.3.5

Proteinspot 6000 fand sich sowohl in der mit Mitoxantron als auch Daunorubicin selektierten Pankreaskarzinomzelllinie signifikant vermehrt im Gegensatz zur parentalen Zelllinie. Die Sequenzierung zeigte, daß es sich um Cofilin handelt.

Proteinspot 6000 (vgl. Abb. 4.3.1 u. 4.3.1) zeigte sowohl in der mit Mitoxantron als auch in der mit Daunorubicin selektierten Pankreaskarzinomzelllinie einen Anstieg der optischen Dichte um mehr als das Doppelte (Abb. 4.3.5).

Für den Proteinspot 6000 ergab sich die Sequenz Tyr-Ala-Leu-Tyr-Asp-Ala-Thr-Tyr-Glu-Ser-Lys und konnte damit eindeutig als Cofilin identifiziert werden.

4.4 Fibrosarkom

Das Standard Image der parentalen Fibrosarkomlinie enthält 391 Proteinspots (Abb. 4.4.1), das der mit Mitoxantron selektierten 463 (Abb. 4.4.2). Nach Erstellung des Matchsets ließen sich 347 (75%) Spots davon beiden zuordnen.

Für vier Proteinspots der resistenten Zelllinie zeigte sich kein Äquivalent in der parentalen Linie. Eine signifikante Änderung der optischen Dichte konnte bei zwei Spots im Sinne einer vermehrten

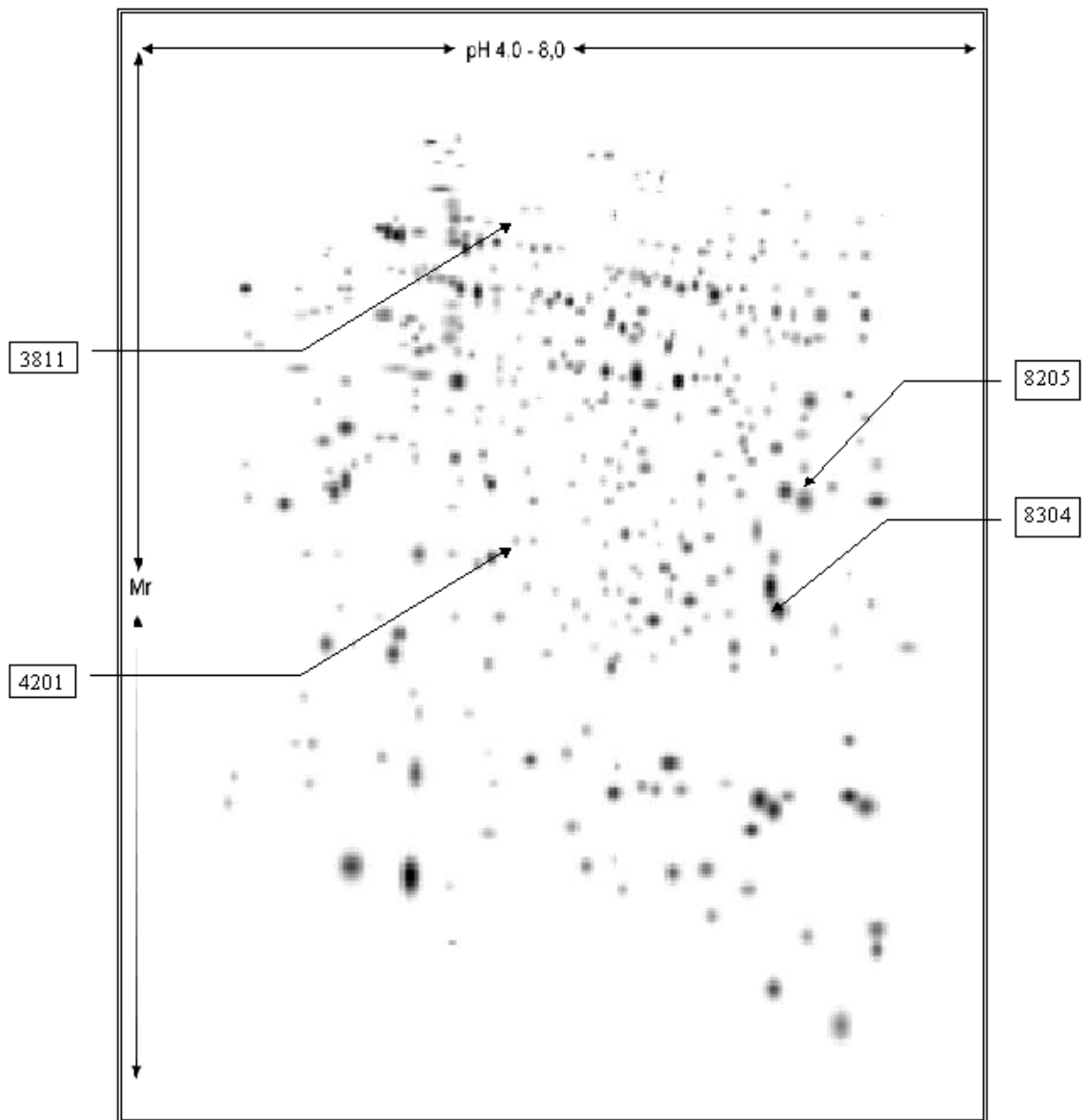


Abbildung 4.4.1

Standard Image der parentalen Fibrosarkomlinie EPF86-079P.

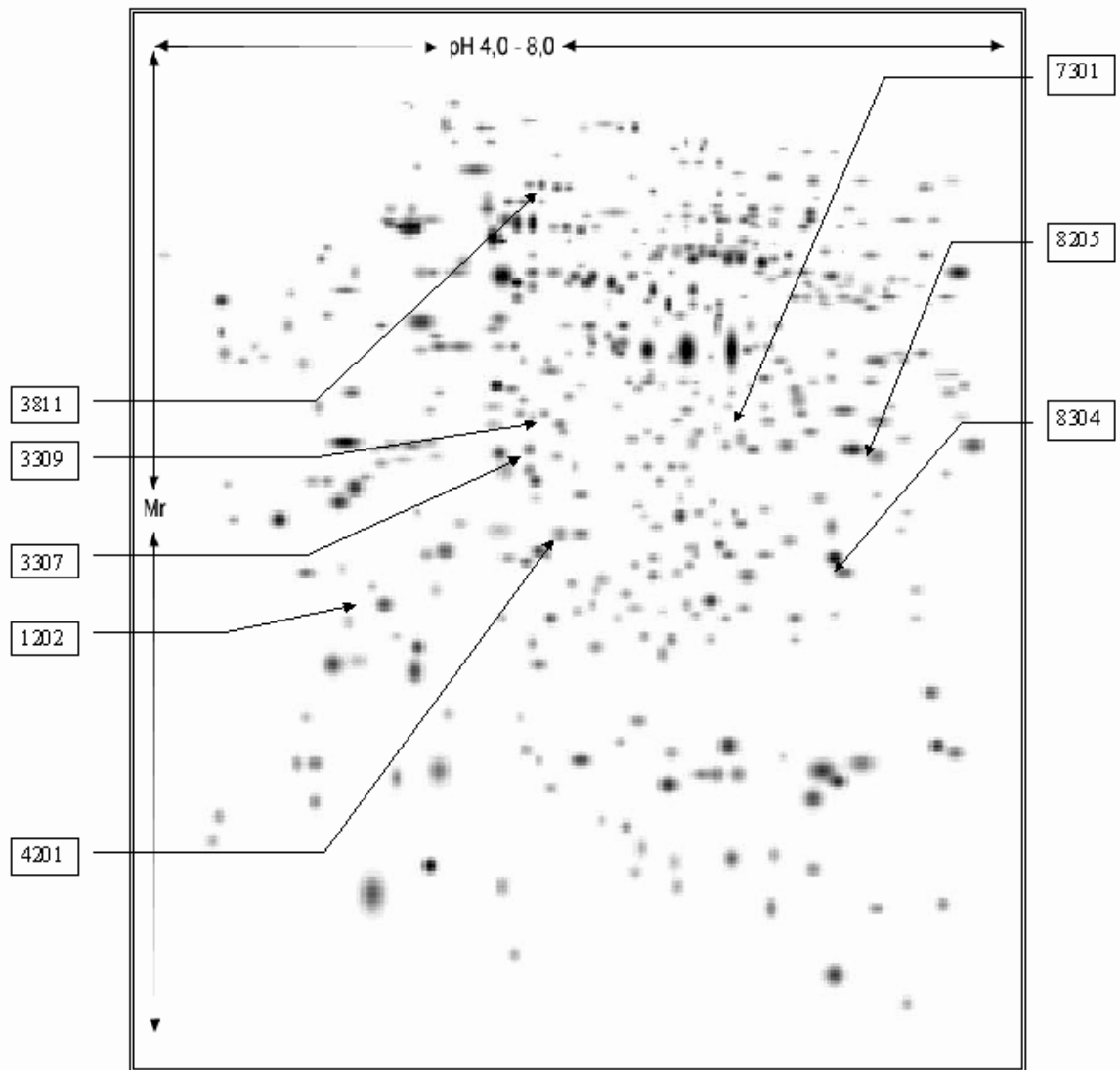


Abbildung 4.4.2

Standard Image der Mitoxantron selektierten Fibrosarkomlinie EPF86-079RNOV.

Expression und in einem Fall als verminderte Expression in der Zelllinie EPF86-079RNOV nachgewiesen werden.

Für den Proteinspot 1202 (Abb. 4.4.3) konnten nach interner Spaltung mit Trypsin in der HPLC vier schwache Massenfingerabdrücke im Reflectormode detektiert werden. Es fanden sich zwei Sequenzen: 1.) Tyr-Val-Glu-His-Thr-Tyr-Arg mit einer 100% Homologie von sieben Aminosäuren und 2.) X-Leu-Leu-Gly-Asp-Val-Pro-Val-Val-Ala-Asp-Pro mit neun Aminosäuren Homologie zu RHO-GDP-Dissoziations Inhibitor-β. Es handelt sich bei Spot 1202 zweifelsfrei um RHO-

GDP-Dissoziations Inhibitor- β .

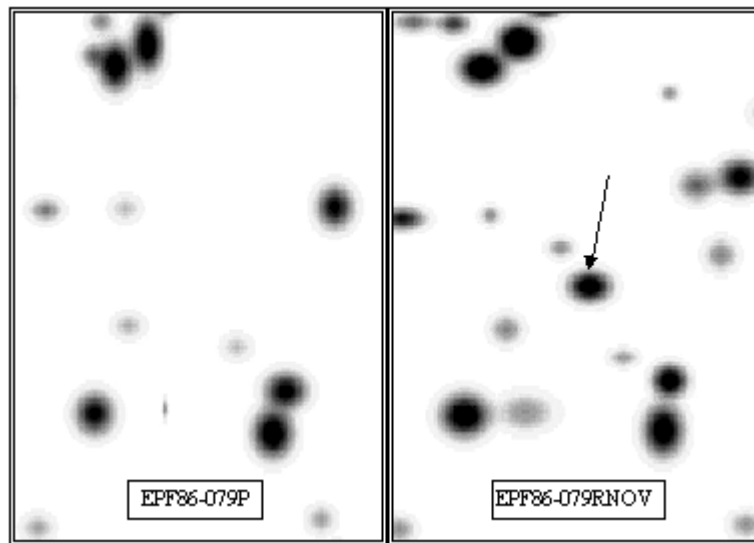


Abbildung 4.4.3

Detailausschnitt mit dem nicht in der parentalen Zelllinie vorhanden Spot 1202.

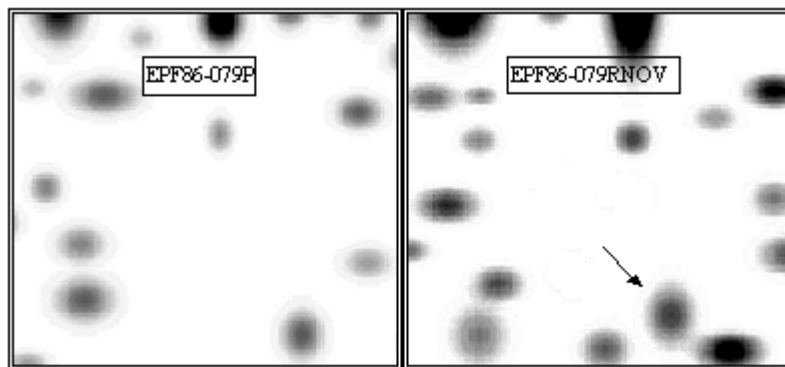


Abbildung 4.4.4

Detailausschnitt mit dem nicht in der parentalen Zelllinie vorhanden Spot 7301.

Nach interner Spaltung mit LysC zeigten sich sechs Massen im Reflectron, die Messung konnte allerdings nicht wiederholt werden. Es konnte ein Polypeptid von 12 Aminosäuren Länge identifiziert werden, dessen Sequenz aber nicht durchgängig lesbar war (X-Ser-Ala-X-Glu-Glu-Ala-Asn-X-Arg-Pro). Die gefundene Sequenz ist in der Zuordnung eher unsicher, als bestes Match fand sich YER7-Yeast; es handelt sich eventuell um ein unbekanntes Protein.

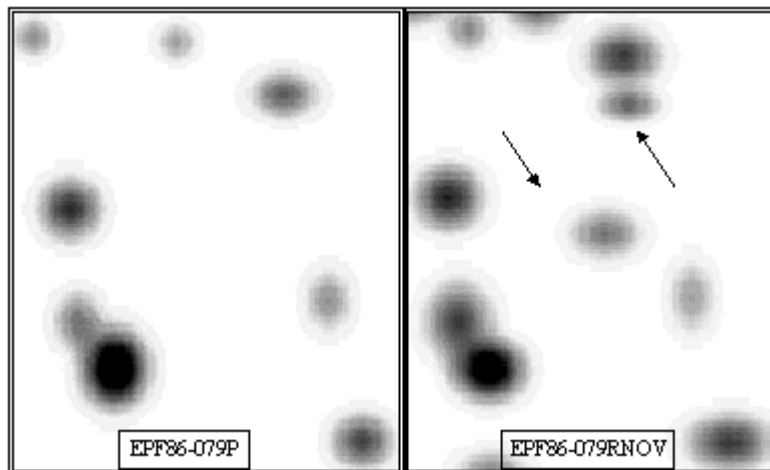


Abbildung 4.4.5

Detailausschnitt mit dem nicht in der parentalen Zelllinie vorhanden Spots 3307/3309.

Die Proteinspots 3307 und 3309 (Abb.4.4.5) konnten in der präparativen zweidimensionalen Elektrophorese nicht mehr reidentifiziert werden; es bestanden ausgedehnte Überlagerungen mit benachbarten angefärbten Proteinen, so daß ein Sequenzierungsversuch unterblieb.

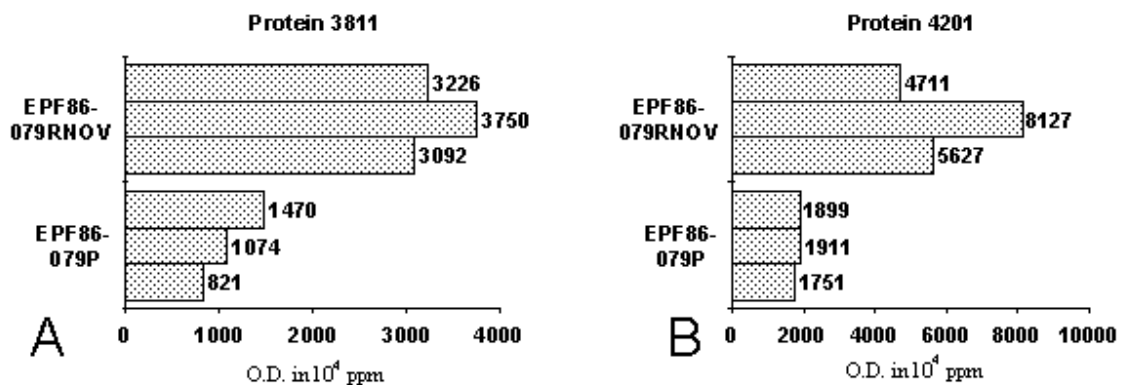


Abbildung 4.4.6

Veränderung der optischen Dichte bei Proteinspot 3811 (A) und 4201 (B) in der mit Mitoxantron selektierten Fibrosarkomzelllinie. In beiden Fällen fand sich in der resistenten Zelllinie eine signifikante Erhöhung der O.D.

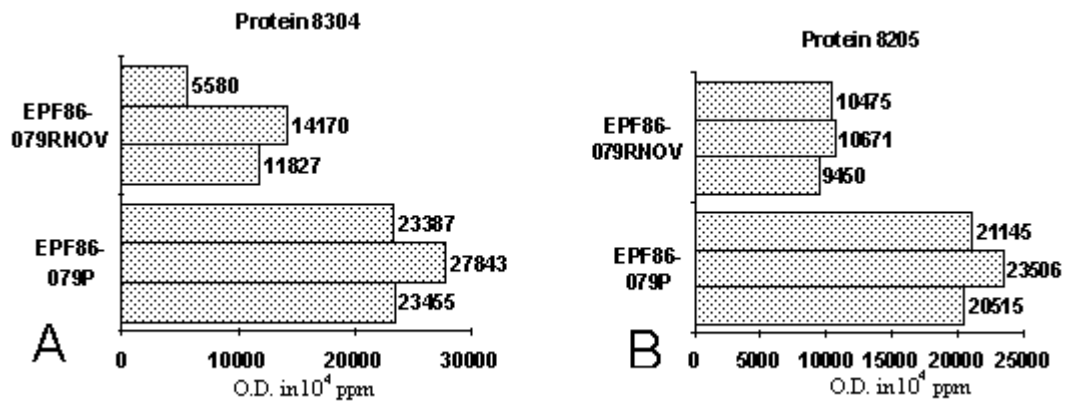


Abbildung 4.4.7

Veränderung der optischen Dichte bei Proteinspot 8304 (A) und 8205 (B) in der mit Mitoxantron selektierten Fibrosarkomzelllinie. In beiden Fällen fand sich in der resistenten Zelllinie eine signifikante Verminderung der O.D.

Für die Proteinspots 3811 und 4201 (Abb. 4.4.6) bestand eine signifikant vermehrte optische Dichte bzw. für die Spots 8304 und 8205 (4.4.7) eine verminderte O.D. in der chemoresistenten Zelllinie. Ein Sequenzierungsversuch wurde für keinen der Spots unternommen.

4.5 Mammakarzinom

Das Standardimage der parentalen Mammakarzinomzelllinie enthielt 597 Proteinspots (Abb. 4.5.1). Zu diesem ließen sich 178 von 218 (81%) aller Spots der resistenten Linie vergleichen (Abb. 4.5.2). Der Spot 6001 fand sich nur in der resistenten Zelllinie MDA-MB-231RNOV. Spot 6201 zeigte eine signifikante Hochregulation bzw. Spot 5601 eine Herabregulation in der Mit mitoxantron selektionierten Mammakarzinomzelllinie in Hinblick auf die verglichenen optischen Dichten.

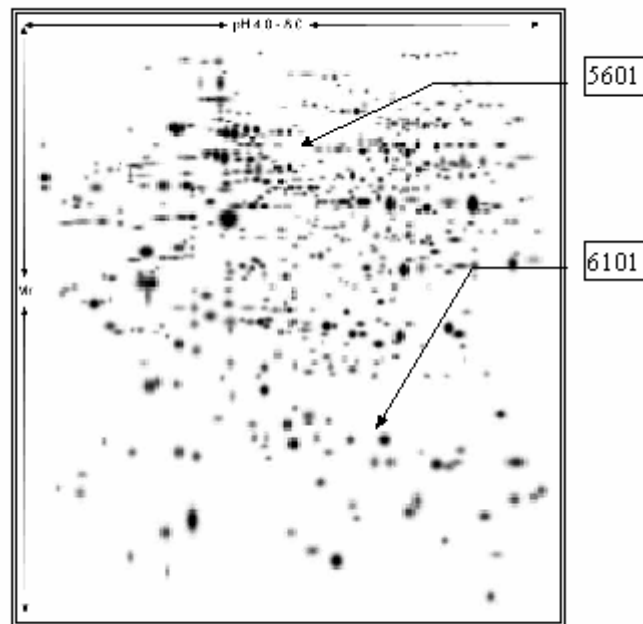


Abbildung 4.5.1

Standardimage der parentalen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231P.

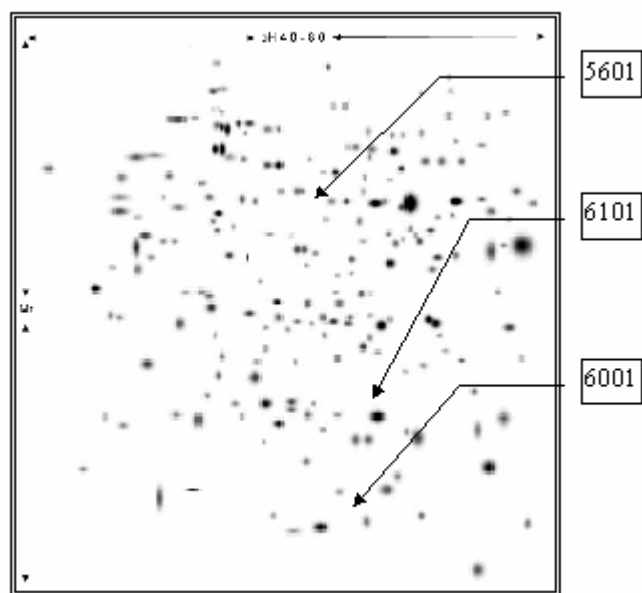


Abbildung 4.5.2

Standardimage der mit Mitoxantron selektierten Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231RNOV.

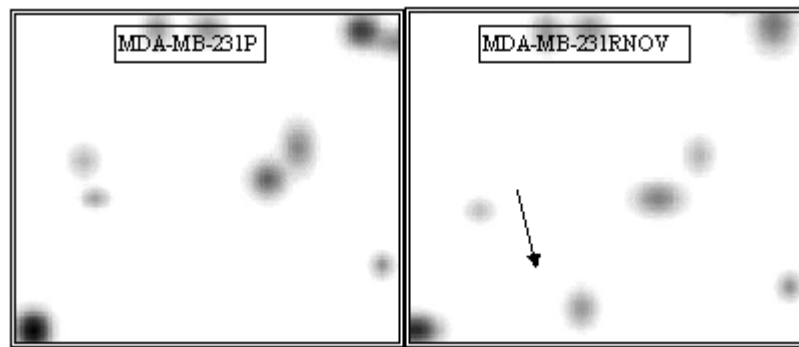


Abbildung 4.5.3

Detailansicht von Proteinspot 6001, der sich nur in der mit Mitoxantron selektierten Mammakarzinomzelllinie fand.

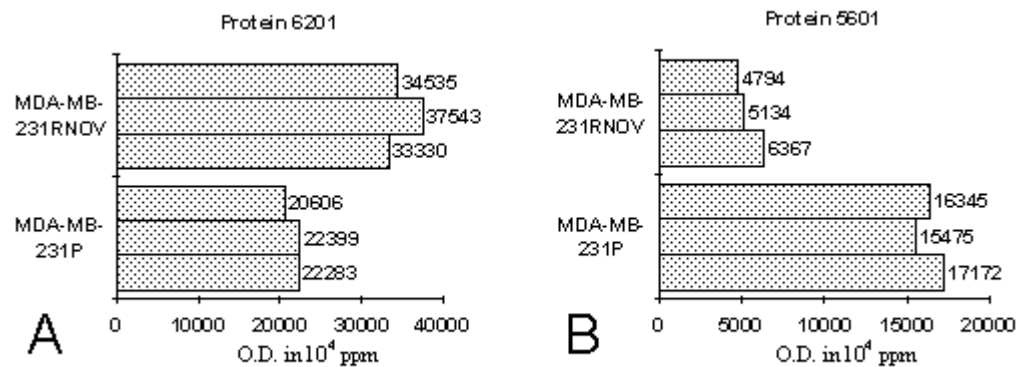


Abbildung 4.5.4

A: Proteinspot 6201 war in der mit Mitoxantron selektierten Mammakarzinomzelllinie signifikant höher exprimiert als in der parentalen.
B: Proteinspot 5601 dagegen fand sich in der parentalen Zelllinie höher exprimiert als in der Resistenten.

Auf Grund der geringen Ausbeute an detektierten Proteinen für eine anschließende Sequenzierung, wurde für die Mammakarzinomzelllinie kein Versuch unternommen, eine präparative zweidimensionale Elektrophorese durchzuführen.

5 Diskussion

5.1 Zur Wahl des benutzten Elektrophoreseprotokolles

Die isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten stellt eine effiziente Methode zur Trennung komplexer Proteingemische dar. Insbesondere bedingt die Verwendung der Immobililine die Reproduzierbarkeit und damit die vergleichende Auswertbarkeit der Ergebnisse. Die konventionelle isoelektrische Fokussierung basiert auf der Verwendung einer Vielzahl von löslichen, amphoteren Puffern, die im elektrischen Feld zu ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt wandern und nach Erreichen desselben den pH-Gradienten konstant aufrecht erhalten (Righetti 1983). Im Gegensatz dazu wird bei der Verwendung immobilisierter pH-Gradienten dieser bereits vor der Elektrophorese generiert. Hierbei sind die Puffer Acrylamidoderivate mit den Eigenschaften einer schwachen Säure bzw. Base, die kovalent an die Polyacrylamidgelmatrix gebunden sind, und damit ein näherungsweise dauerhaft stabiler pH-Gradient geschaffen wird (Bjellqvist 1982).

Die Anwendung des immobilisierten pH-Gradientens ist prinzipiell schon seit 1982 bekannt, jedoch bestanden aufgrund der chemischen Struktur der Acrylamidopuffer über lange Zeit Probleme in der breiteren Nutzung. Zum einen bestand die Möglichkeit der Autopolymerisation der basischen Acrylamidopuffer, zum anderen die der Hydrolyse der Amidbindung; beides mit weitreichenden negativen Folgen für die Durchführung der Gelelektrophorese.

Diese Probleme führten zur Etablierung von Acrylamidopuffern, deren basischer Anteil 0,2 M Propanol und deren saurer Anteil geringe Mengen eines Polymerisationsinhibitors (Hydrochinon) enthielten (Gaveby 1988). Dank dieser neuen Generation von Acrylamidopuffern kann heute die isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten als weitgehend störungsfrei mit bisher nicht erreichten Auflösungsvermögen bezeichnet werden.

Speziell für die Durchführung der 2-D-Elektrophorese für meine Aufgabenstellung ergaben sich folgende Gesichtspunkte:

1. Das Protokoll zur Durchführung der 2-D-Elektrophorese.
2. Den zu verwendenden pH-Bereich in der ersten Dimension.
3. Das adäquate Proteinnachweisverfahren.

Ad 1. Das von mir benutzte Protokoll nach Rabilloud bietet den Vorteil, keine Änderungen, außer der eingesetzten Proteinmenge, bei analytischer und präparativer 2-D-Elektrophorese vornehmen zu müssen. Damit ergibt sich eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die Analyse der detektierten Änderungen im Proteinmuster.

Ad 2. Mit der Einführung der Immobiline war es möglich Gradienten für einen Bereich von pH 4 bis 8 zu generieren. In diesem Bereich ist die Pufferkapazität des Wassers zu vernachlässigen, welche aber außerhalb des Bereiches exponentiell ansteigt und damit den Aufbau eines Gradienten verhindert (Righetti 1989). Überwunden werden konnte diese Problematik durch die Neusynthese von Acrylamidopuffern die einen pK von 3,1 bzw. 10,3 besitzen (Gelfi 1987; Sinha 1987).

Die Überlegung, nicht den erweiterten Gradientenbereich zu benutzen gründet sich darauf, daß der überwiegende Anteil der Proteinfraction sich im pH Bereich von 4-8 repräsentiert.

Ad 3. Zur Auswahl standen zwei unspezifische Proteinnachweisverfahren: die Silberfärbung und die Färbung mit Coomassie Blau.

Die Silberfärbung ist eine extrem empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Die Nachweisempfindlichkeit beträgt 0,005 µg gegenüber 0,5 µg der entsprechenden Coomassie Färbemethoden und kommt in ihrer Sensitivität an die der Autoradiographie heran.

Die Detektion sehr geringer Proteinmengen mit Coomassie Blau erfordert konzentrierte Proteinlösungen bzw. große Probenvolumina. Die daraus resultierenden Elektrophoresemuster sind manchmal durch Überlagerungen gestört und das Auflösungsvermögen vermindert.

Obwohl die Silberfärbung weitaus empfindlicher ist, hat sie dennoch einige

entscheidende Nachteile gegenüber der mit Coomassie Blau: kleine Abweichungen vom Färbeprotokoll können sehr starke Auswirkungen auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit und vor allen auf die Hintergrundfärbung haben. Außerdem ist der lineare Bereich bei der densitometrischen Auswertung sehr schmal. Gerade die letzten beiden Punkte erschweren die Auswertung mit dem PDQUEST System bzw. machen sie unmöglich. Daher wurde bei allen Gelen die Coomassiefärbung durchgeführt, mit den Vorteilen: bessere Reproduzierbarkeit, fast hintergrundfreie Färbung ohne Entfärbeschritt durch die Verwendung der kolloidalen Färbemethode nach Neuhoff und ein größerer Linearitätsbereich bei der densitometrischen Auswertung.

Die Reproduzierbarkeit von Proteinkarten, die mit Hilfe der 2-D-Elektrophorese erstellt wurden ist abhängig von der Probengewinnung, der Probenapplikation, von der Vergleichbarkeit in der Qualität der Gele der ersten und zweiten Dimension, von der Gelfärbung und schließlich von der Qualität der verwendeten Chemikalien-Charge (Klose 1995).

Für die Auswertbarkeit der erstellten Proteinkarten ist in erster Linie die Qualität der Gele der ersten und zweiten Dimension entscheidend, in zweiter Linie die Färbung; die übrigen Einflußgrößen spielen eine untergeordnete Rolle (Görg 1988).

Die Basis der Reproduzierbarkeit bildet aber die Elektrophorese der ersten Dimension und damit kommt den Immobilen eine entscheidende Rolle zu. Allerdings ist es bekannt, daß die frei beweglichen Proteine selbst, auf Grund ihrer eigenen Ladung, ähnliche negative Effekte aufweisen können, wie die Trägerampholyte und damit die Reproduzierbarkeit von Versuch zu Versuch verschlechtern können (Klose 1995).

Dabei ist insbesondere die absolute und relative Position der Proteinpunkte auf dem Gel und deren Intensität zu beachten. Dank der rechnergestützten Auswertung tritt die Bedeutung der absoluten Positionen im Gel als Kriterium der Auswertbarkeit hinter den relativen Positionen zurück. Durch die Auswertungsoptionen des PDQUEST-Systemes lassen sich charakteristische Proteinspots als Fixpunkte definieren; angrenzende Proteinspots lassen sich dann

in der Regel einfach manuell oder automatisch richtig zuordnen, auch wenn deren absolute Positionen stärker differieren.

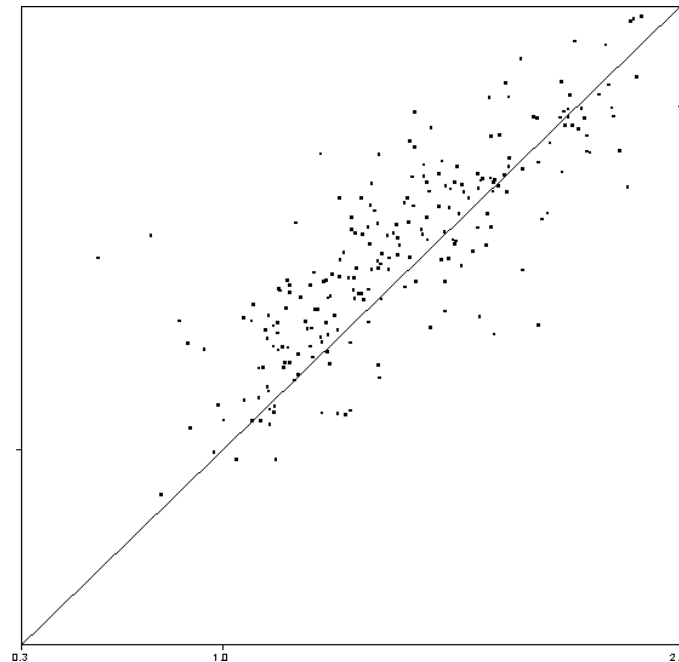


Abbildung 5.1.1

Beispiel für die absoluten Abweichung der Spotquantitäten zweier Pankreaskarzinomzelllinien. Aufgetragen ist die Abweichung eines Gels in der optischen Dichte zu einem Vergleichsgels der gleichen Charge. Der Korrelationskoeffizient beträgt in diesem Fall 0.82 bei $N = 293$

5.2 Pharmakologische Eigenschaften der eingesetzten Chemotherapeutika im Hinblick auf bekannte Ursachen der Resistenzentwicklung

5.2.1 Daunorubicin

Das den Anthrazyclinen zugehörige Daunorubicin wird eine Vielzahl unterschiedlicher biochemischer Effekte zugeschrieben, wobei der exakte Mechanismus der Zytotoxizität nicht völlig aufgeklärt ist (Aubel 1984). Einigkeit besteht in der Erkenntnis, daß die Wirkung auf Tumorzellen mit einer Veränderung der Nukleinsäurensynthese einhergeht. Es gibt Hinweise darauf, daß der Mechanismus der Zytotoxizität in Abhängigkeit zum jeweiligen Gewebetyp steht.

Daunorubicin gelangt schnell in die Zelle, wobei sich die höchste Konzentration im

Zellkern findet. Die Anthracycline binden sich mit hoher Affinität an die DNA. Ihr aglykoner Anteil schaltet sich in die parallelen Anteile der gegenüberliegenden Basenpaaren ein. Die ionisierte Aminogruppe des Zuckeranteils bindet zum Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA.

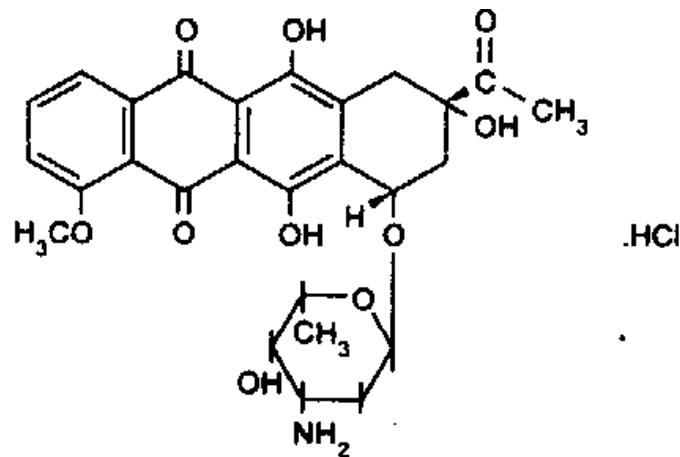


Abbildung 5.2.1

Strukturformel von Daunorubicin: (1S,3S)-3-Acetyl-1-2,3,4,6,11-hexahydro-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxo-naphthalen-1-yl 3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxopyranoside hydrochlorid

Aus der Bindung resultiert eine Inhibition der DNA-Polymerase sowie der RNA-Polymerase. Der Effekt auf die DNA-Synthese ist in erster Linie eine verminderte Rate der Ketten-Elongation mit eher untergeordnetem Effekt auf die Zellreplikation. Die Einschränkung der r-RNA ist demnach der wichtigste Faktor der Zytotoxizität (Ross 1979a).

Das mikrosomale Enzym P450-Reduktase katalysiert die Reduktion von Daunorubicin zu einer Semichinonform, welche dann ein Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen kann, um freie Radikale und Peroxide zu bilden. Andere Flavin abhängige Oxireduktasen sind ebenfalls befähigt, diesen Prozeß zu katalysieren (Ross 1979b).

Es ist gängige Meinung, daß Daunorubicin die DNA Funktion beeinträchtigt, indem es durch die Bildung von freien Radikalen Einzelstrangabbrüche und Fragmentierungen der DNA erzeugt. Bestätigung findet diese These dadurch, daß eine Verminderung der Radikale durch Enzyme wie Manganese Superoxid Dismutase, die als Antioxydanz wirken, die Toxizität vermindert werden kann (Kule 1994).

Da die Zytotoxizität von Daunorubicin auch schon in niedrigeren Konzentrationen auftritt, als zur Interferenz mit der DNA notwendig wäre, sind einige andere alternative Mechanismen postuliert worden. So z.B. die Hemmung der zellulären Atmung, Veränderungen der Zellmembranfunktion und die Beeinträchtigung der Membranpermabilität für Natrium und Kalzium (Gonsalvez 1974).

Intrazellulär wird Daunorubicin, wie auch andere Anthrazyklinie, durch Karbonylreduktion inaktiviert. Die Steigerung dieses Mechanismus scheint für die Ausbildung einer sekundären Resistenz wichtig zu sein (Soldan 1996). Darüber hinaus und sicherlich für eine Chemoresistenz bedeutender ist die Rolle von PGP in der Elimination von Daunorubicin aus der Zelle.

5.2.2 Mitoxantron

Mitoxantron besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu den Anthracyclinen Doxorubicin und Daunorubicin und ist ein wirksamer Inhibitor der RNA und DNA Synthese.

Es interkaliert mit der DNA und bewirkt Kreuzverbindungen innerhalb und zwischen den DNA-Strängen mit Bevorzugung der G-C Basenpaare (Lown 1985). Mitoxantron ist nicht zellzyklusspezifisch, auch wenn proliferierende Zellen sensibler sind als stationäre. Direkt zytotoxisch auf die Zelle wirkt Mitoxantron im Zusammenspiel mit Cytochrom P-450 Reduktase. Es kommt zur Bildung von Semiquinonradikalen, die wiederum zellschädigende Peroxide bilden (Durr 1983). Fernerhin ist für Mitoxantron bekannt, daß die Interferenz mit Topoisomerase II für die zytotoxische Wirkung bedeutsam ist (Crespi 1985; Smith 1990), wie dies auch bei anderen interkalierenden Chemotherapeutika beschrieben wurde (Tewey 1984). Ein weiterer Aspekt der antiproliferativen Wirkung von Mitoxantron ist seine Inhibition der Proteinkinase C (Takeuchi 1992).

Intrazellulär wird Mitoxantron auf zwei Wegen metabolisiert: zum einen durch eine Konjugation an Glucuronsäure, zum anderen durch die Koppelung an Glutathion was eine vorherigen Umsatz von Mitoxantron durch Cytochrom P-450 voraussetzt (Wolf 1986).

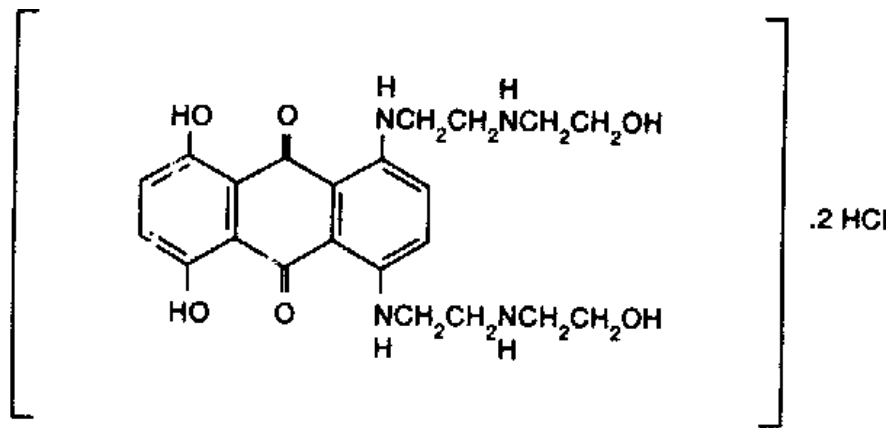


Abbildung 5.2.2

Über die Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber Mitoxantron ist nur wenig bekannt. Zurückliegende Studien deuten darauf hin, daß eine Überexpression von PGP nicht an der Ausbildung des MDR Phänotypes beteiligt ist (Harker 1989). Auch die vermehrte Bildung des MRP scheint nicht die entscheidende Rolle in der Resistenzentwicklung zu spielen, wie das an mehreren Zelllinien gezeigt werden konnte (Futscher 1994).

Vielmehr hat sich die Interaktion mit Topoisomerase II als ein wichtiger Faktor für die reduzierte Ansprechbarkeit gegenüber Zytostatika herausgestellt. Untersuchungen an HL-60 Leukämie Zellen zeigten eindeutig eine geringere katalytische Aktivität der Topo II und eine verminderte Expression der Topoisomerase II β Isoform (Harker 1991). In Hinblick auf den Abbauweg von Mitoxantron ist es denkbar und am Beispiel eines Kolonkarzinomes auch darstellbar, daß eine vermehrte Inaktivierung durch Glutathion-S-Transferase an der Ausprägung der Resistenz beteiligt ist (Peters 1992).

Schließlich ist über die von mir benutzten Magenkarzinomzelllinie bekannt, daß eine Sequestrierung von Mitoxantron zu einer verminderten intrazellulären Wirkkonzentration und damit zur Ausbildung einer Resistenz beitragen kann (Dietel 1990).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Magenkarzinom

5.3.1.1 *Annexin-1*

Sowohl in der gegen Mitoxantron resistenten Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV als auch in der gegen Daunorubicin resistenten Zelllinie EPG85-257RDB konnte ein Proteinspot (Nr. 4302) nachgewiesen werden, der sich nicht in der parentalen Zelllinie wiederfand (vgl. Abb. 4.1.5). Die Sequenzierung des Spots ergab, daß es sich dabei um Annexin-1 (Syn.: Lipocortin-1) handelt.

Annexin-1 ist ein 37 kDa großes Protein der Annexin Familie, das ursprünglich das Interesse als Second Messenger der antiinflammatorischen Wirkungen von Glukokortikoiden geweckt hat. In diesem Hinblick gemachte Untersuchungen zeigten weitere Funktionen dieses Proteins auf: so im Wachstums- und Differenzierungssystem der Zelle, der Migration neutrophiler Granulozyten, der ZNS-Antwort auf Zytokine, der neuroendokrinen Regulation und der neuronalen Degeneration.

Annexin-1 ist Mitglied der Familie von Ca^{2+} /phospholipidbindender Proteine und ist das Hauptsubstrat für die Rezeptorkinase des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), die in die Membranprozesse der Endozytose involviert ist.

Annexin-1 ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt, einschließlich Membrandiffusion und Regulation der Aktivität des Kalzium-Kanals. Insbesondere scheint Annexin-1 in der Granularzellschicht der Epidermis mit der Exozytose assoziiert zu sein (Ma 1996).

Es konnte dargestellt werden, daß A1 unabhängig an Kalzium und cAMP bindet, beides mit funktionellen Konsequenzen. Damit konnte für A1 als erstem Vertreter der Annexin Familie eine Nukleotidbindung nachgewiesen werden (Cohen 1995).

Unter dem Gesichtspunkt der antiinflammatorischen Eigenschaften zeigt sich, daß diese bei lokaler Anwendung von Annexin-1 in erster Linie auf einer Hemmung der

Phospholipase-A₂ und damit der Prostaglandinbildung beruhen; in vivo allerdings stellte es sich als ein wirksamer Inhibitor der zytokinvermittelten Leukozytenmigration, wie durch Interleukin-1, dar.

Gemeinsam mit Glukokortikoiden ist Annexin-1 fernerhin an der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung beteiligt. Die positiven Wirkungen von Glukokortikoiden auf Zellwachstum und -differenzierung lassen sich durch Antikörper gegen Annexin-1 wirkungsvoll aufheben. Annexin-1 transloziert unter dem Einfluß von Glukokortikoiden zur Zelloberfläche, und vermag dort ApoA-1 zu binden. ApoA-1 ist in den HDL vermittelten Cholesterolmetabolismus involviert; ferner vermag es *in vitro* das Wachstum von T-Lymphozyten zu stimulieren und die Degranulation und Peroxidbildung von Neutrophilen Leukozyten zu inhibieren (Bronawell 1996).

Die Regulation des Zellwachstums durch Steroide ist aus mehreren Gründen ein wichtiger Gesichtspunkt: Jeder Mechanismus, der die Zellproliferation kontrolliert, muß sorgfältig auf seine Verbindungen zu Tumorzellwachstum und Chemotherapie untersucht werden, insbesondere weil Wachstumsprozesse Ausdruck oder Teil einer vermehrten Reparationsaktivität der Zelle darstellen können. In diesem Zusammenhang ist auch die protektive Wirkung von Annexin-1 auf die neuronale Degeneration zu erwähnen (Flower 1994).

Zu der mindestens acht Mitglieder zählenden Annexinfamilie gehört auch das Annexin-2, für das eine Assoziation mit Chemoresistenz beim Lungenkrebs beschrieben wurde. Bemerkenswert ist, daß die verschiedenen Annexine eine enge strukturelle Verwandtschaft aufweisen. Dies läßt die Vermutung zu, daß sie wahrscheinlich überlappende Aktivitätsspektren aufweisen (Cole 1992b). Jedes Mitglied aus dieser Familie besitzt 4 bzw. 8 siebzig Aminosäuren lange Kerndomänen, die für die Kalzium- und Phospholipidbindung verantwortlich sind. Über diese Kerndomänen, die ein Substrat für die Proteinkinase C darstellen, wird die Aktivität der Annexine durch Phosphorylation reguliert (vgl. Abb. 5.3.4).

Annexin-1 konnte überwiegend in tumorösen aber auch nichttumorösen Regionen des Leberzellkarzinomes gefunden werden, besonders bei schlecht differenzierten Tumoren. Interessanterweise fand es sich auch in der Nähe von hepatozellulären Karzinomen im nicht tumorösen Gewebe, das sich histologisch vom umgebenen Parenchym abgrenzen ließ. Dies zeigt, daß Annexin-1 sehr wahrscheinlich in den

Prozeß der malignen Transformation und Differenzierung involviert ist (Masaki 1996). In diesem Zusammenhang ist es daher auch bemerkenswert, daß -in meinem Untersuchungsmaterial- gerade im Magenkarzinom eine vermehrte Expression von Annexin-1 nachgewiesen werden konnte, obwohl Annexin-1 physiologisch nicht im Magenschleimhautgewebe vorkommt (Dreier 1998).

Die inhibitorischen Eigenschaften gegenüber der Phospholipase-A₂ sind offenbar auch der Grund dafür, daß Annexin-1 -am Beispiel von Thymozyten- diese vor der apoptotischen Wirkung von H₂O₂ schützt. Monoklonale Antikörper gegen Annexin-1, wie auch andere Inhibitoren der Phospholipase-A₂, wie 3,4-Octadecyl-Benzylacrylsäure oder Melittin bewirken eine H₂O₂ vermittelte gesteigerte Apoptose (Sakamoto 1996).

5.3.1.2 Thioredoxin

Nur in der gegen Mitoxantron resistenten Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RNOV konnte ein Proteinspot (Nr. 1003) nachgewiesen werden, der sich nicht in der parentalen Ausgangszelllinie wiederfand (vgl. Abb. 4.1.4). Die Sequenzierung dieses Spots ergab, daß es sich um Thioredoxin handelt. Thioredoxin (TRX) gehört zu den Redoxproteinen mit niedrigem Molekulargewicht und wird von dem Flavoenzym Thioredoxinreduktase durch NADPH abhängige reversible Reduktion zweier aktiven Stellen reguliert.

Reduzierende/oxydierende (Redox)-Prozesse sind in eine Vielzahl biologischer Systeme integriert, wie Signaltransduktion, Genexpression und Zellproliferation. TRX ist eines der wichtigsten Regulationsmoleküle für Redoxvorgänge, da seine Dithiol/Disulfid Austauschaktivität den oxydativen Status der Proteinthiole bestimmt. In zahlreichen Zelllinien konnte TRX als starker Stimulus für die Zytokinexpression wie für Tumornekrosefaktor sowie Il-1, Il-2, Il-6 und Il-8 gefunden werden (Schenk 1996).

Die cDNA-Sequenz von Thioredoxin durch PCR-Klonierung aus menschlichem Dickdarmkrebs, Lymphoblasten und Leberzellen zeigt eine 100% Übereinstimmung mit dem autokrinen Wachstumsfaktor ADF für T-Lymphozyten (human adult T-cell leukemia derived factor) (Gasdaska 1994)

Die proliferationsfördernde Wirkung von TRX/ADF ist abhängig von Aktivierung der Proteinkinase C. Viele elementare Funktionen der Zelle, wie etwa die Aktivität des AP-1 Komplexes, NF κ B und des Glukokortikoidrezeptors sowie der Schutz vor H₂O₂ und letztlich die Signaltransduktionen sind vom Redoxpotential abhängig. Und gerade diese Funktion wird durch Thiolderivate wie Glutathion, Metallothionein und eben TRX/ADF reguliert (Meyer 1993).

Thioredoxin ist demnach ein wachstumsstimulierendes Redoxprotein von dem bekannt ist, daß es in zahlreichen menschlichen Tumoren überexprimiert wird. Die Redoxaktivität ist entscheidend für die proliferationssteigernde Wirkung, denn mit TRX transfizierte Zellen zeigen ein vermehrtes Wachstum und eine verminderte Apoptose in vivo und vitro. Zellen die mit einer redoxinaktiven TRX-Mutante transfiziert wurden, haben dagegen eine deutlich verminderte Proliferationsrate (Powis 1998).

Thioredoxin konnte erst kürzlich als das entscheidende Regulationsprotein für die Apoptosesignalregulierende-Kinase-1 (ASK-1) identifiziert werden. ASK-1 aktiviert die c-Jun-N-terminale-Kinase die für die durch α -TNF induzierte Apoptose erforderlich ist. TRX inhibiert die Wirkung von ASK-1 und damit die subsequente Apoptose (Saitoh 1998).

Eine Überexpression von TRX ist bei Ovarial- und Kolonkarzinomen gefunden worden, die eine Resistenz gegen Cisplatin zeigten. Allerdings konnte durch Transfektion von TRX in sensible Zelllinien kein signifikanter Anstieg der Chemoresistenz erreicht werden. Die Vermutung liegt nahe, daß Thioredoxin an der Ausbildung des resistenten Phänotyps mitbeteiligt ist, aber nicht die alleinige oder dominierende Rolle spielt (Yamada 1997).

Andererseits gelang es durch Transfektion von Thioredoxin in Thymozyten der Maus, diese vor -in vivo und in vitro- induzierter Apoptose durch Dexmethason, Staurosporin und Etoposid zu schützen (Baker 1997).

Die Regulation von TRX erfolgt über die Thioredoxinreduktase (TR), die einen

möglichen Angriffspunkt für die Chinone Diazichinon und Doxorubicin darstellt. Im Rhabdomyosarkommodell konnte eine direkte positive Korrelation zwischen Hemmung der TR-Aktivität und Proliferation festgestellt werden. Der mögliche Grund für diese Beobachtung ist die verminderte Aktivität der Ribonukleotidreduktase, die den ersten gemeinsamen Schritt der DNA-Synthese katalysiert und die ihre reduzierende Äquivalente durch Thioredoxin wie TR erhält (Mau 1992).

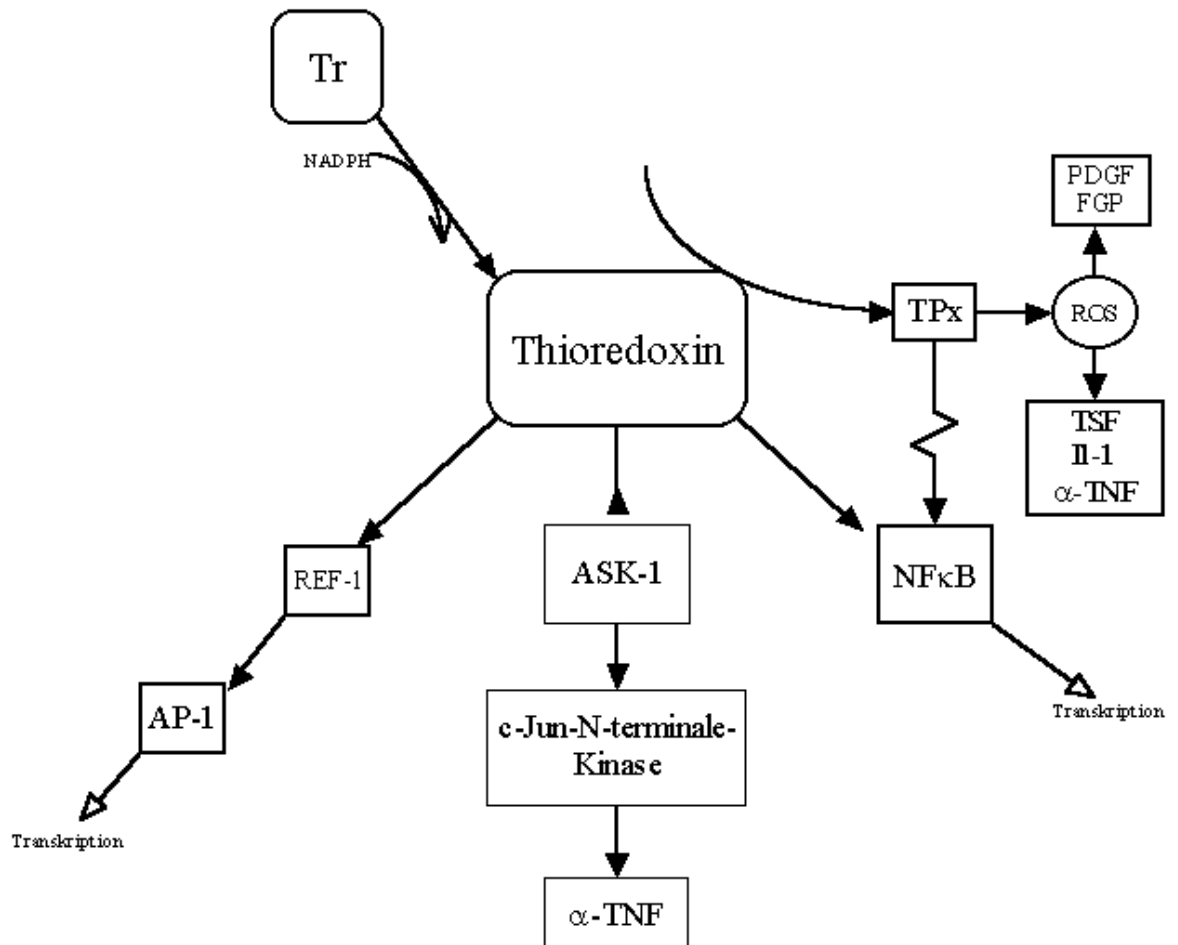


Abbildung 5.3.1

Zusammenfassung der bekannten Funktion von Thioredoxin. Thioredoxin dient auch als temporärer Elektronendonator für die Thioredoxin Peroxid Reduktase (TPx) deren genaue Funktion unbekannt ist. Eine Verbindung zu den reaktiven Sauerstoffspezien und eine Beteiligung im intrazellulären Signaltransfer ist denkbar. Tpx = Thioredoxin Peroxid Reduktase; ROS = reaktive Sauerstoffspezien; PDGF/FGF = Peptidwachstumsfaktor; TSF = Transformationswachstumsfaktor; Tr = Thioredoxinreduktase.

Damit konnte gezeigt werden, daß Thioredoxin tiefgreifend an der Regulation des Zellwachstums und der Onkogenese involviert, fernerhin mit großer Wahrscheinlichkeit auch an der Ausbildung einer Chemoresistenz, wenn auch nicht als alleiniger und entscheidender Faktor, beteiligt ist. Trotzdem rückt damit Thioredoxin als pharmakodynamischer Angriffspunkt in das Interesse einer medikamentösen Beeinflussung im Hinblick auf eine Resensibilisierung oder eines komplett neuen Ansatzes für künftige Chemotherapeutika. Inzwischen konnten Disulfide wie das Alkyl-2-Imidazolyl-Disulfid gefunden werden, die selektiv starke inhibitorische Wirkung auf das Thioredoxin-System haben (Powis 1998).

5.3.2 Kolonkarzinom

5.3.2.1 BCSG-1

Nach Abschluß der Matchauswertungen fand sich in der gegen Daunorubicin resistenten Kolonkarzinomzelllinie HT29RDB der Proteinspot Nr. 105, der nur dort und nicht in der parentalen Zelllinie nachweisbar war (vgl. Abb. 4.2.7). Die Sequenzierung für den Spot 105 ergab, daß es sich um ein mit BCSG-1 sehr eng verwandtes Protein handelt. In einer von Ji und Mitarbeitern durchgeführten Datenbankrecherche von cDNA-Bibliotheken, wurde die dort abgelegten Sequenzen von Brustkrebs mit normalem Brustdrüsengewebe verglichen. Im Hinblick auf eine spezifische Expression auf Seiten der malignen Zellen konnte sie eine Sequenz identifizieren, von der sie dann experimentell darlegen konnten, daß sie in normalem Gewebe der Brustdrüse nicht, bei dukталen Karzinomen teilweise, aber regelmäßig bei invasiv wachsenden Tumoren vorkommt. Die so ermittelte Sequenz wurde als brustkrebsspezifisches Gen 1 (BCSG-1) bezeichnet.

Interessanterweise zeigt die Aminosäuresequenz von BCSG-1 eine enge Homologie zu einem Teil des Amyloidvorläufers beim M. Alzheimer. Die

transmembranären Amyloidproteine sind große membranüberspannende Proteine, die neuroprotektiv die Zelle vor einem zu großen Kalziuminflux schützen. Die löslichen Amyloidproteine wirken wahrscheinlich durch ihre Fähigkeit den intrazellulären Kalziumspiegel zu senken, protektiv gegen die toxischen Einflüsse von Glukoseverarmung und Glutamat.

Die exakte Funktion des BCSG-1 ist unbekannt; nach den Überlegungen von Ji und Mitarbeitern ist jedoch denkbar, dass es in Anlehnung zum löslichen Amyloid des M. Alzheimers, Tumorzellen vor den lokalen schädlichen Wirkungen während der Gewebeinvasion schützt (Ji 1997). Die Rolle von BCSG-1 in der Ausbildung einer Chemoresistenz ist somit noch offen.

5.3.2.2 Adenin-Phosphoribosyltransferase

Nur in der gegen Mitoxantron resistenten Kolonkarzinomzelllinie konnte der Spot 3201 nachgewiesen werden, der in der Sequenzierung als Adenin-Phosphoribosyltransferase identifiziert werden konnten (vgl. Abb. 4.2.4).

Beim hydrolytischen Abbau von Nukleinsäuren und Nukleotiden entstehen freie Purinbasen. Durch Wiederverwertungsreaktionen, die einfacher und weniger aufwendig sind als der de novo Aufbau, können Purinnukleotide aus solchen Bauteilen zurückgewonnen werden. Bei dieser salvage-Route wird eine Ribosephosphateinheit vom 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) auf das Purin übertragen. Für die Wiederverwertungsreaktion stehen zwei Enzyme mit unterschiedlicher Spezifität zu Verfügung: 1.) Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und 2.) die Adenin-Phosphoribosyltransferase.

Eine gesteigerte Expression der Adenin-Phosphoribosyltransferase in der chemoresistenten Tumorzelllinie kann Ausdruck einer vermehrten Nukleotidbildung im Zusammenhang mit einem vermehrten Umsatz von DNA und RNA sein. Diese wäre bei gesteigertem Wachstums oder Reparaturvorgängen, sowie bei der Steigerung einer oder mehrerer Genprodukte zu erwarten.

5.3.3 Pankreaskarzinom

5.3.3.1 *Das fettsäurebindende Protein*

In der Sequenzierung von Spot 6002, der sich nur in der gegen Mitoxantron resistenten Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RNOV wiederfand, konnte dieser als fettsäurebindendes Protein vom epidermalen Typ (E-FABP) identifiziert werden (vgl. Abb. 4.3.3).

Die fettsäurebindenden-Proteine bilden eine Gruppe von 14-15 kD großen zytosolischen lipidbindenden Proteinen, die ursprünglich als Z-Proteine benannte wurden. Sie sind Carrier, die in einer Vielzahl von Zelltypen am Transport von langen Fettsäuren, Gallensäuren, organischen Anionen und anderen, schwer wasserlöslichen Metaboliten beteiligt sind (Takikawa 1992).

Zusammen mit den retinolbindenden Proteine (CRtBP) bilden sie eine strukturell und funktionell zusammengehörige Gruppe, in einer in der Evolution konservierten Genfamilie.

Zahlreiche Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß FABP den intrazellulären Spiegel an Fettsäuren reguliert. Neuere Überlegungen sehen einen Zusammenhang in der Rolle der FAB-Proteine bei fettsäureabhängigen Prozessen wie Zellwachstum, Zellsignale und Regulation von Gentranskription. Inzwischen sind acht verschiedene FAB-Proteine isoliert worden, jeweils benannt nach dem Gewebe, in dem sie zuerst entdeckt wurden. Jedes von ihnen zeigt ein charakteristisches Vorkommensmuster und unterschiedliche Ligandenbindungseigenschaften, die eine spezifische Funktion für jedes Protein vermuten lassen (Masouyé 1997).

Die genauen Funktionen von FABP und CRtBP sind nur ungenügend bekannt. Ungeachtet der funktionalen Unterschiede zeigen sich deutlich die Gemeinsamkeiten beider Protein-Gruppen in: 1.) der Förderung des zellulären Flusses von schlecht wasserlöslichen Liganden und damit deren Umsetzung; 2.)

die Sequestration von Liganden zur Limitierung alternativer Bindungsstellen in der Zelle (Bass 1993).

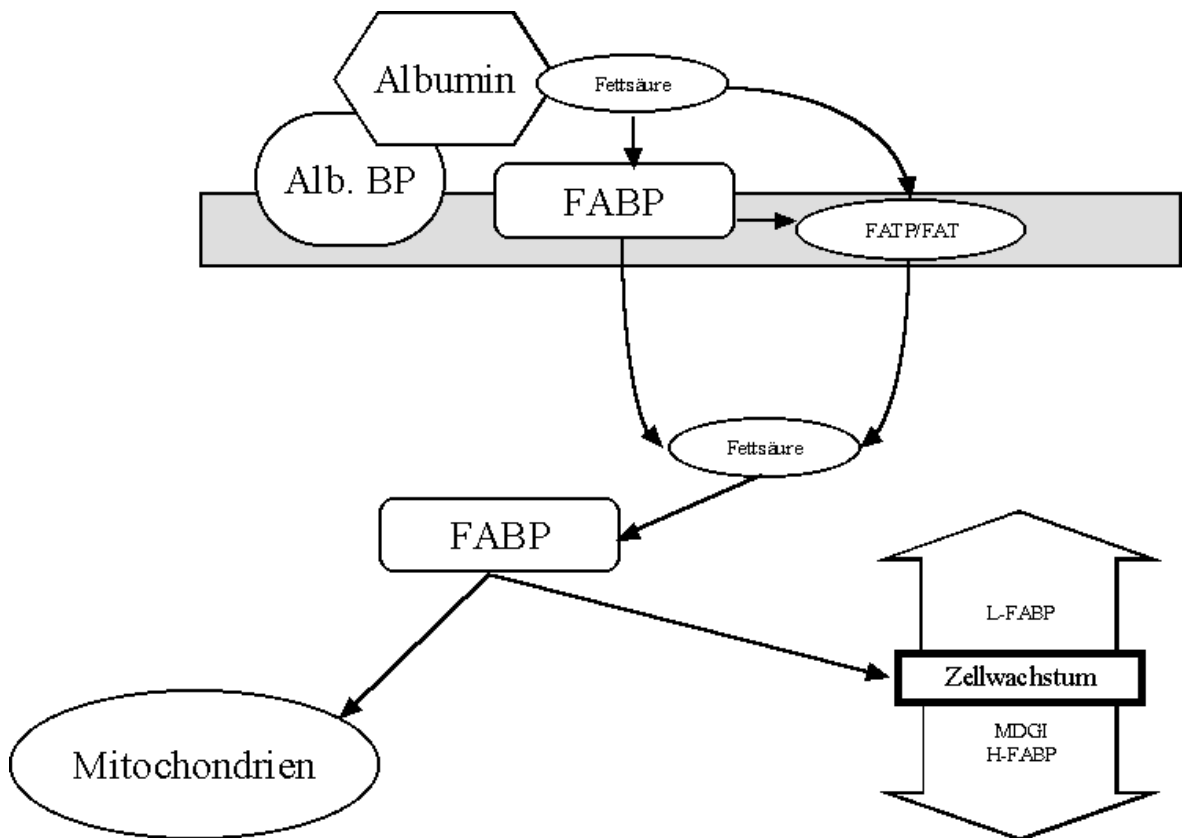


Abbildung 5.3.2

Funktion der FAB-Proteine: An Albumin gebundene Liganden (in diesem Fall Fettsäuren) werden alternativ über membrangebundenes FABP bzw. andere Transportproteine in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär gelangen die Liganden zu ihren Zielorten. Der Effekt von FABP auf das Zellwachstum ist je nach Typ diametral (Mod. n. Hohoff 1998 und Glatz 1997). Alb. BP = Albumin bindendes Protein; FATP = Fettsäuretransportprotein; FAT = Fettsäuretranslokase.

Die zellulären fettsäurebindenden Proteine gehören außerdem zu einer homogenen Familie aus zahlreichen Untereinheiten, zu der auch der Brustdrüsenwachstumsinhibitor (MDGI) gehört, der nahezu identisch mit dem FABP vom Herztyp ist. Sie sind sowohl am intrazellulären Fettsäuremetabolismus beteiligt, wie auch an Zellwachstum und -differenzierung. Am Beispiel des MDGI wird z.Z. diskutiert, ob dessen wachstumshemmende und differenzierungsfördernde Wirkung in der Behandlung des duktales Mammakarzinomes eingesetzt werden kann (Grosse 1995).

Unabhängig davon konnte gezeigt werden, daß im Mäusemodell bei einer Behandlung eines Mammakarzinomes mit Liposomen aus gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren, ein Anstieg des Zellwachstums signifikant mit einem Anstieg der FABP vom Herztyp assoziiert war (Naundorf 1995).

Das in der Leber zuerst isolierte L-FABP hat sich als spezifischer Mediator der Leberzellmitose offenbart, wobei zum einen eine Synergie mit ungesättigten Fettsäuren in der Induktion der Mitose besteht. Zum anderen zeigt es sich in der speziellen Erfordernis an nichtgenotoxischen Karzinogenen für diese Induktion und schließlich in den erhöhten Spiegeln von L-FABP in der Proliferation von regenerativer und maligner Leberzellen (Sorof 1994).

Die epidermale Form des FABP ist bisher in ihrer Verteilung nur im Zusammenhang mit irritativen, immunologischen und malignen Prozesse untersucht worden. So konnte bei experimentell wiederholter Reizung der Haut mit SDS eine starke Hochregulation für E-FABP erzeugt werden.

In der Verteilung findet sich E-FABP im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum im normalen Hautgewebe. Die Basalzellschicht bleibt frei und folgerichtig findet man E-FABP nur in gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen und nicht in Basalzellkarzinomen (Masouyé 1997).

Es bleibt zu klären ob -im Hinblick auf den Resistenzmechanismus in unserem Probenmaterial- Mitoxantron ein Substrat für FABP darstellt. Derartige Untersuchungen die eine Antwort darauf geben können, ob FABP am Transport von Chemotherapeutika und speziell für Mitoxantron innerhalb oder aus der Zelle heraus beteiligt sein kann, liegen mir nicht vor.

5.3.3.2 *Stratifin*

Die Sequenz für Spot 205 war klar detektierbar und ergab ein 100% Match zu Stratifin. Spot 205 zeigte sich in der gegen Mitoxantron resistenten Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RNOV signifikant höher exprimiert als in der Ausgangszelllinie (vgl. Abb. 4.34).

Stratifin ist ursprünglich durch Sequenzierungsversuche in einer Datenbank für Keratinozyten entdeckt worden, aber seine Funktion blieb bisher unbekannt.

Inzwischen konnte Stratifin als Keratinozyten zugeordnetes Protein und als Stimulator der Proteinkinase C identifiziert werden. Zu den Keratinozyten zugeordneten Proteinen gehören zwei eng verwandte Isoformen die als Sigma (Statifin) und Zeta bzw. 14-3-3-Protein bezeichnet werden (Dellambra 1995; Leffers 1993). Stratifin gehört zu einer Gruppe von Proteinen die außerdem noch Annexin-II und CaN19 einschließt, die als kalziumbindende Proteine fungieren und über die Regulation der Proteinkinase C Zellproliferation und -differenzierung beeinflussen können. Die Proteinkinase C ist, wie auch deren 12 Isoenzyme, in vielfältige Signaltransduktionswege involviert. Durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten können sie Proteine, die in der Chemoresistenz eine Rolle spielen, funktionell modifizieren. Bekannte Substrate sind das P-Glykoprotein, die Glutathion-S-Transferasen sowie die Topoisomerase I und II (Lage 1998) (vgl. Abb. 5.3.4). Ein weiteres Substrat, daß von Stratifin aktiviert wird ist YL-8, ein *ras*-ähnliches Protein, daß in der Regulation des intrazellulären Proteintransportes involviert ist (Vellucci 1995).

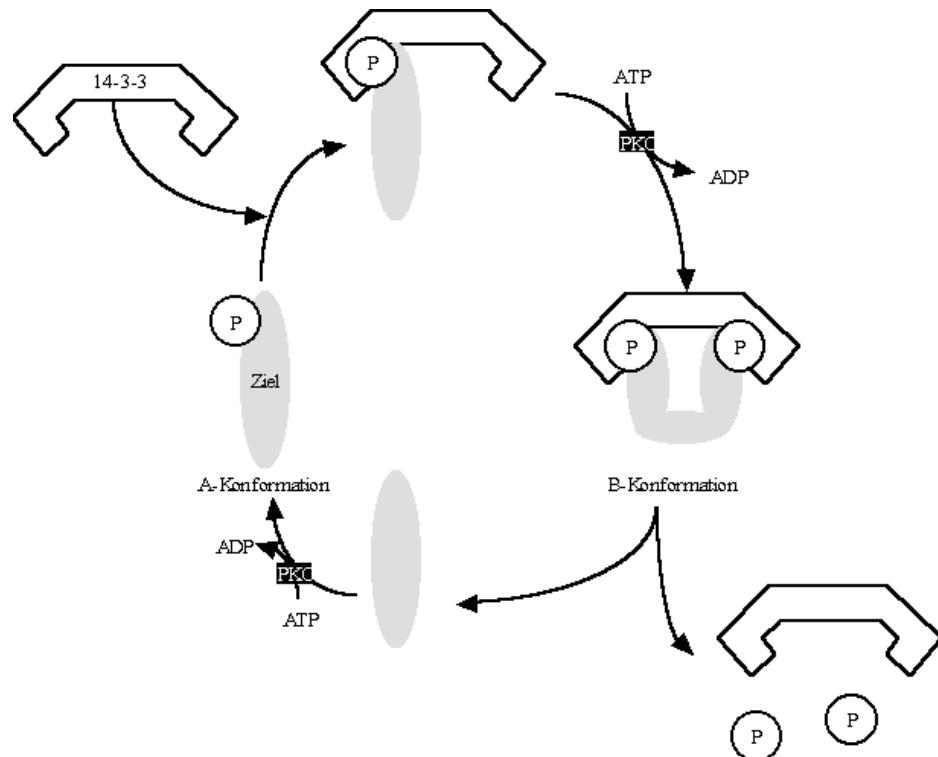


Abbildung 5.3.3

Funktion der mit Stratifin eng verwandten 14-3-3 Proteine. Die Aufgabe von 14-3-3 besteht in der Regulation von einem Zielprotein,

für das zwei Konformationen bestehen, die unterschiedliche Aktivitätszustände haben (mod. n. Palmgren 1998).

Die Behandlung des kolorektalen Karzinomes durch ionisierende Strahlung, läßt die Tumorzellen in der G1 und G2 Phase des Zellzyklus verharren, wobei es sich in der G1 Phase um eine p53 vermittelte Induktion des cyclinabhängigen Kinase Inhibitoren p21^{WAF1/CIP1/SDI1} handelt. Die Grundlagen für das Verharren in der G2 Phase sind unbekannt.

Am Beispiel des Dickdarmkrebses konnte gezeigt werden, daß die Bildung von Stratifin durch Gammastrahlung und andere DNS schädigende Agenzien stimuliert werden kann. Dies erfolgt durch die Induktion einer Stelle der DNS 1,8 kb vor der Startstelle für die Transkription und zwar durch ein auf p53 reagierendes Element. Die exogene Zufuhr von Stratifin bei sich replizierenden Zellen bewirkt einen Zellarrest in der G2 Phase.

Welche exakte Rolle Stratifin im Zusammenspiel der Mechanismen der Chemoresistenz zukommt, ist noch weiterhin klärungsbedürftig. Zumindest die Fähigkeit von Stratifin in die Phasen des Zellzyklus einzugreifen macht es zu einem interessanten Untersuchungsobjekt in der Suche nach chemoresistenzassoziierten Faktoren.

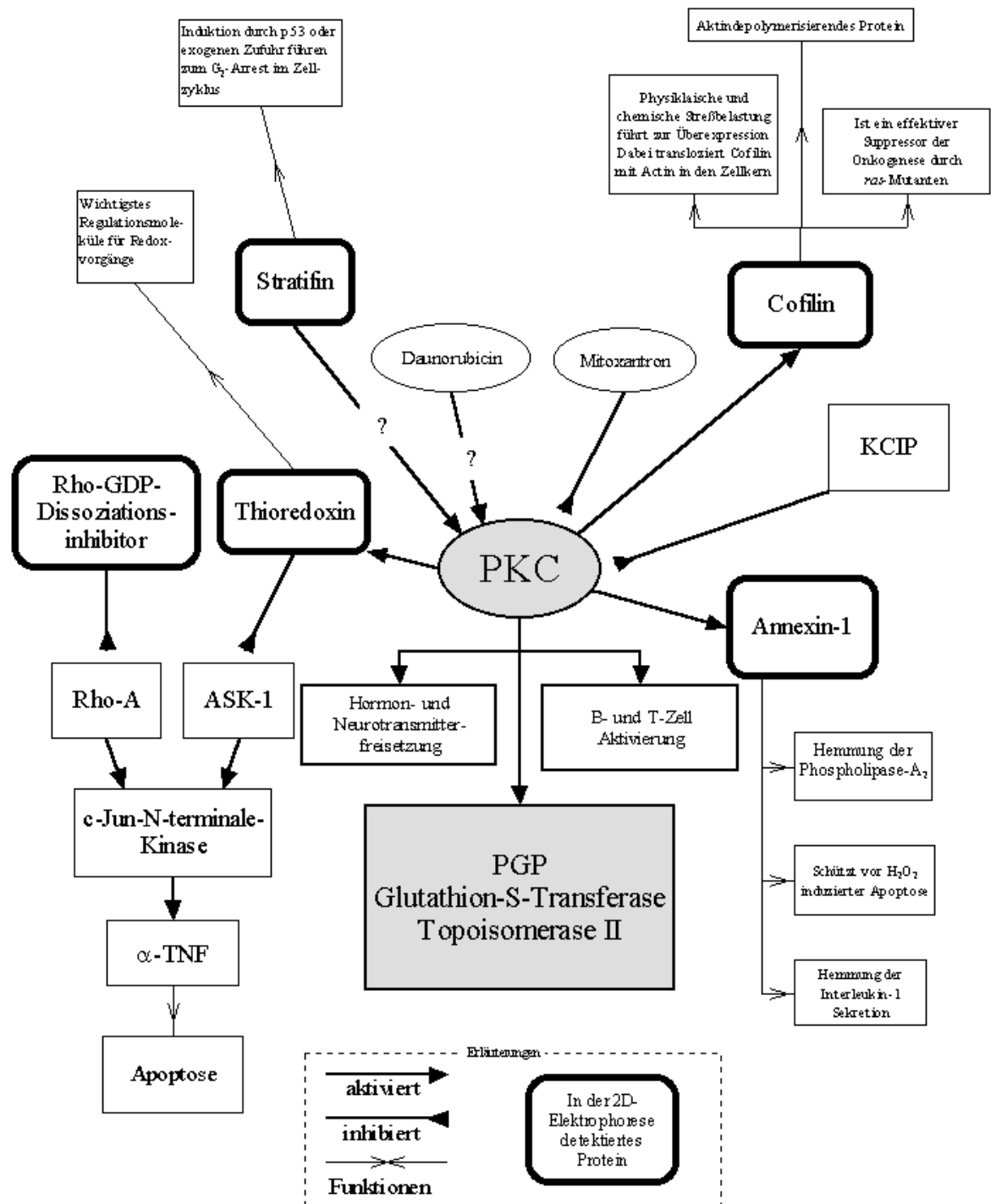


Abbildung 5.3.4

Vereinfachtes Schema zur Rolle von Stratifin, Cofilin, Annexin-1 und Thioredoxin im Zusammenspiel mit der der Proteinkinase C im Hinblick auf Aspekte der Chemoresistenz. PKC= Proteinkinase C; KCIP= Proteinkinase C-Inhibitor; PGP= P-Glykoprotein.

5.3.3.3 Cofilin

Sowohl in der gegen Mitoxantron als auch in der gegen Daunorubicin resistenten Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RNOV bzw. EPP85-181RDB konnte der Proteinspot 6000 als signifikant überexprimiert gegenüber der parentalen Zelllinie dargestellt werden (vgl. Abb. 4.3.5). Der Proteinspot 6000 wurde in der Sequenzierung eindeutig als Cofilin identifiziert.

Cofilin ist ein Aktin depolymerisierendes Protein, das in tierischen und pflanzlichen Zellen weit verbreitet ist. Aktinfilamente in Nicht-Muskelzellen sind dynamische Strukturen, die sich ständig auflösen und neu bilden. Sie werden durch schrittweise Addition von Aktinmonomeren an freien Enden verlängert. Aktin enthält ein einziges gebundenes Nucleotid, ATP oder ADP, und katalysiert die langsame Hydrolyse von gebundenem ATP zu ADP. Die freien Aktinmonomere polymerisieren nicht spontan, weil aktinbindende Kontrollproteine anwesend sind, von denen schon über fünfzig bekannt sind und zu denen auch das ADF/Cofilin-System zählt.

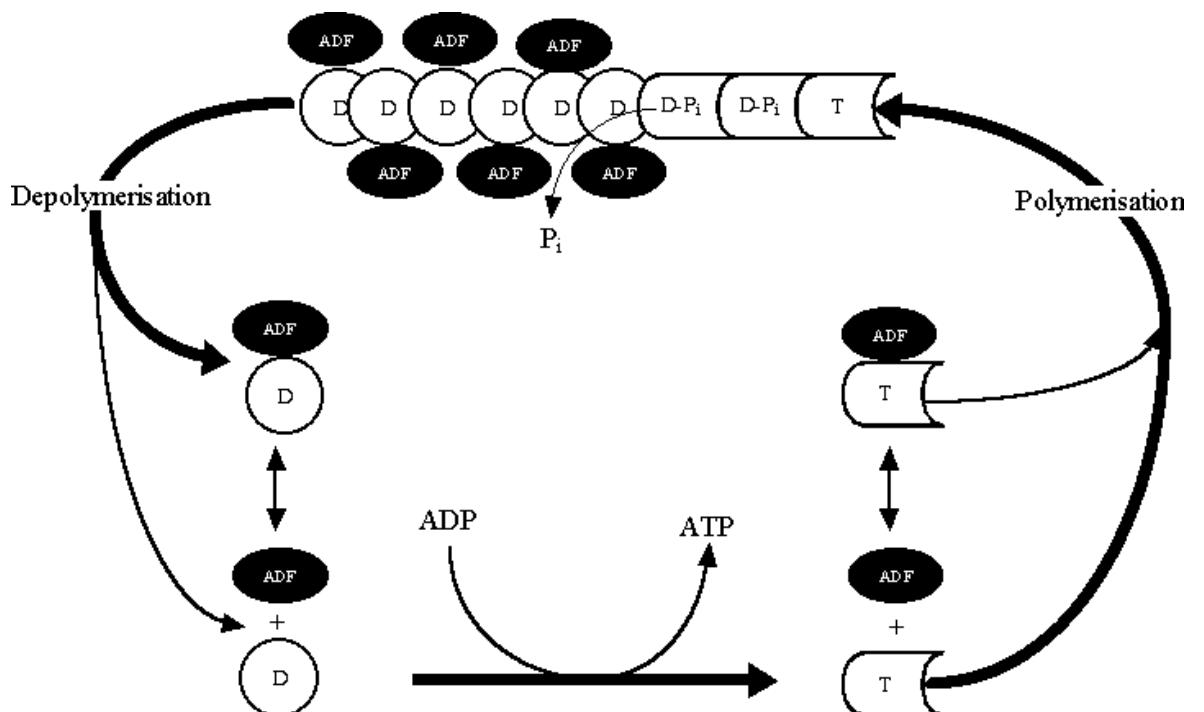


Abbildung 5.3.55.3.2

Physiologie der Aktindepolymerisation durch die ADF/Cofilin Wirkung. Cofilin bindet an ADP-Aktin und fördert damit die Aktin

Depolymerisation zu Aktin-Monomeren, die nach Phosphorylierung erneut für die Polymerisation zur Verfügung stehen. Der An- und Abbau von Aktin-Monomeren ist für alle Veränderungen der Zellmorphologie einschließlich Zellteilung, -motilität und Membranverschmelzung essentiell (mod. n. Carlier 1997). T = ATP-Aktin; D-P_i = ADP-Aktin-Phosphat; D = ADP-Aktin.

Cofilin bindet kooperativ Aktinfilamente, indem es zwei längs ausgerichtete Aktinuntereinheiten überbrückt. Als eine Besonderheit vermag Cofilin die Windung der Aktinfilamente zu verändern, so daß die Aktinquerverbindungen etwa 75% kürzer sind als normale (McGough 1997).

Zelluläre Streßbelastungen sowie verschiedene andere Stimuli führen zu einer Überexpression von Cofilin, wie es durch Hitzeschock und Dimethylsulfoxid experimentell belegt werden konnte. In diesem Zusammenhang besteht für Cofilin eine nukleäre Signalsequenz, die in den Zellkern zusammen mit Aktin transloziert. Über die Funktionen dieses Mechanismus ist fernerhin nichts bekannt (Yahara 1996).

In nicht wachstumsstimulierten Zellen sind die meisten schnellwachsenden Enden der Aktinfilamente von einem 1:1 Komplex aus Aktinmonomer und Profilin -einem PIP2 Protein- bedeckt.

Bei einer Stimulation der Mitose durch Zytokine wie EGF oder PDGF wird *Ras* und in Folge *Rac* aktiviert. *Rac* aktiviert die PI-4-Kinase, die PIP2 erzeugt, welches Profilin bindet und den Profilin-Aktin-Komplex dissoziiert; die Folge ist eine rasche Aktinpolymerisation. Das Aufdecken der Aktinfilamente ist ein wesentlicher Faktor für die Onkogenität von *Ras*. Cofilin kann das Aufdecken verhindern und ist damit ein effektiver Suppressor für die durch onkogene *Ras*-Mutanten wie v-Ha-*Ras* induzierte maligne Transformation (Maruta 1997).

Schließlich scheint Cofilin als intrazellulärer Messenger für die T-Zell-Aktivierung zu wirken, wo es als assessorischer Rezeptor für die Kostimulation wirkt. In untransformierten T-Lymphozyten korreliert dieser Prozeß gut mit der Aktivierung funktioneller Prozesse, die für die T-Zell Proliferation notwendig sind (Samstag 1994). In diesem Zusammenhang ist auch eine Beobachtung von Bedeutung, die ursprünglich an dem T-Zell Lymphom Jurkat gemacht wurde (Samstag 1994). Dort konnte die spontane Dephosphorylation von Cofilin nachgewiesen werden, das

dann in den Zellkern transloziert. Hemmt man diese Spontandeposphorylation durch den Serinphosphatase-Inhibitor Okadaic-Säure, führte dies zur Apoptose der Lymphomzellen (Nebl 1996; Samstag 1996).

Auch wenn sich in den bisher dargelegten bekannten Eigenschaften von Cofilin nicht exakt ableiten läßt, wie und in welchem Umfang es an der Ausbildung der Resistenz beteiligt ist, weist die Assoziation von Cofilin mit dessen Einfluß auf die Replikation -insbesondere in Verbindung mit den Onkogenen- auf eine wichtige Funktion innerhalb des Zellzyklus hin. Insbesondere die Verbindung zu der protektiven Wirkung auf die Apoptose am Beispiel des Jurkat-Lymphomes deutet darauf hin, daß Cofilin Teil des Resistenzmechanismus sein kann.

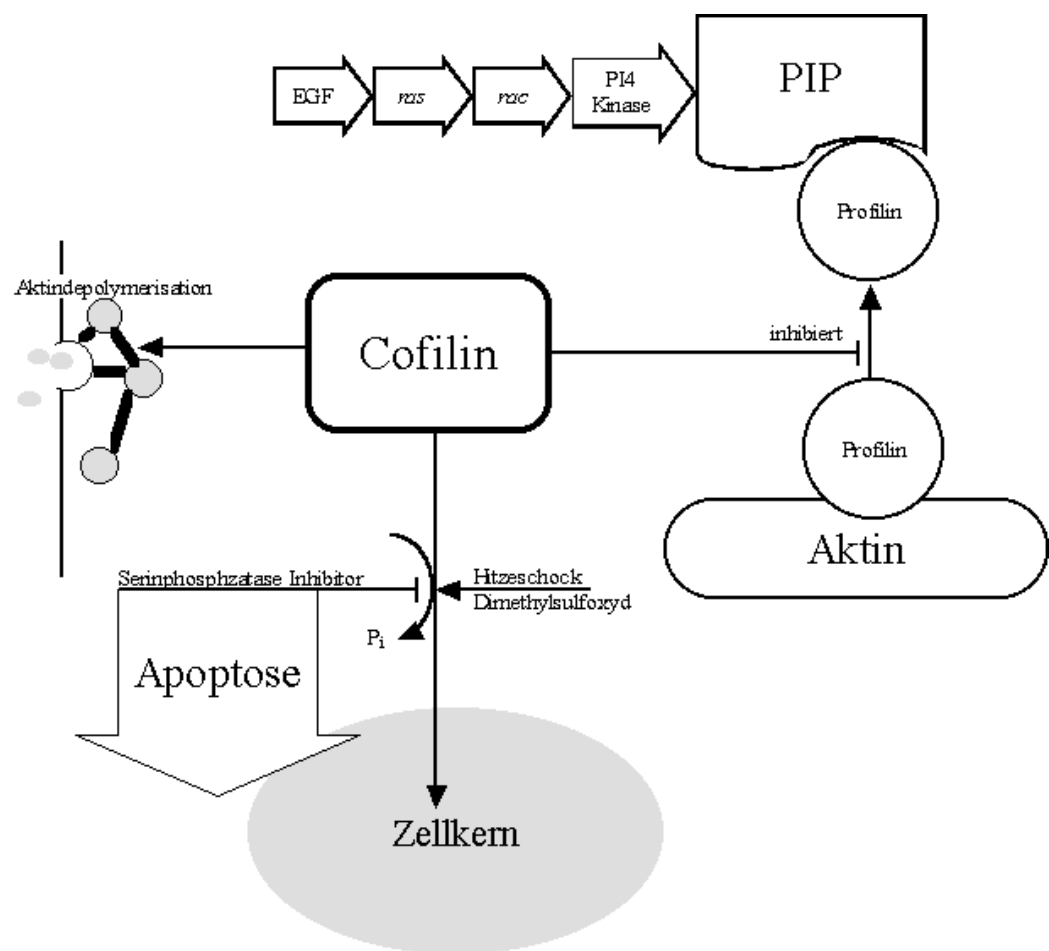


Abbildung 5.3.6

Bekannte Aspekte von Cofilin: Neben der Aktindepolymerisation verhindert Cofilin, daß PIP Profilin vom Aktin abzieht und damit eine rasche Aktinpolymerisation. Ungeklärt ist die Rolle der nukleären Signalsequenz nach Dephosphorylation von Cofilin. Eine Inhibierung diese Dephosphorylierung mündet in die Apoptose.

5.3.4 Fibrosarkom

5.3.4.1 *RHO-GDP-Dissoziationsinhibitor-β*.

In der mit Mitoxantron selektierten Fibrosarkomzelllinie EPF86-079RNOV konnte der Proteinspot 1202 nicht zum Standard der parentalen Zelllinie gematched werden. Die Sequenzierung von Spot 1202 ergab, daß es sich um den RHO-GDP-Dissoziations Inhibitor-β handelt, der sich sonst physiologisch vorzugsweise in hämatopoetischen Geweben einschließlich Knochenmark, Milz, Thymus und Lymphknoten nachweisen läßt.

Es interagiert mit der GDP-gebundenen Form von RhoA, das zu der Familie der kleinen GTPase-Proteine (G-Proteine) gehört und regelt damit den GDP/GTP Austausch, indem es die Dissoziation von GDP zu diesem verhindert (vgl. Abb. 5.3.7). Die G-Proteine der Rho-Unterfamilie regulieren das Erzin/Radixin/Moesin (ERM) CD44 System, welches in der Reorganisation der Aktinfilamente des Zytoskelettes involviert ist (Takahashi 1997).

Zu den Rho-Proteinen zählen RhoA,B,C, *rac* 1, 2, Cdc42, RhoG, TC10 und RhoE. G-Proteine der Rho Familie regulieren mannigfaltig die entzündliche Zellaktivität, einschließlich Motilität und Bildung toxischer Sauerstoffmetaboliten sowie die Bildung von Zytokinen (Hall 1998; Antonarakis 1998; Sasaki 1998). Weiterhin bestehen Hinweise, daß Rho-Proteine in der Regulation der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Zheng 1994), Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (Chong 1994), Phospholipase D (Malcom 1994) und Integrin-vermittelte Signalübertragung eingeschaltet sind (Laudanna 1996). Sie sind an der Kontrolle der Endozytose (Lamaze 1996), der Transkription (Hill 1995), der Zellzyklusregulation (Olson 1995), der Apoptose (Moorman 1996) und der Transformation beteiligt (Khosravi-Far 1995).

Experimentell konnte belegt werden, daß ein defiziente Regulation in der GTPase -in diesem Fall durch eine modifizierten RHO-GDP-Dissoziationsinhibitor-β zu einer irreversiblen Gewebeschädigung führt (Danley 1996).

einem apoptotischen Stimulus. Dies schließt die Aktivierung von Interleukin-1 β -Konversionsenzym (ICE) ähnlichen Proteasen zur Spaltung der endogenen Substrate, wie ADP-Ribosepolymerase und dem RHO-GDP-Dissoziationinhibitor- β , ein (Xiang 1996).

Damit ergibt sich das Bild, daß der RHO-GDP-Dissoziationinhibitor- β eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion in Verbindung mit Rho bzw. *Rac* und ganz besonders mit *Bax* einnimmt. RHO-GDP-Dissoziationinhibitor- β ist in Hinblick auf die Mechanismen der Chemoresistenz ein interessantes Objekt, weitere Aspekte seiner Wirkung auf Zellzyklus oder dessen Interaktion mit den Onkogenen offenzulegen.

5.4 Die Bedeutung der Forschung zum MDR-Phänotyp für die klinische Praxis

5.4.1 Klinische Relevanz der MDR assoziierten Proteinexpression

Die Bedeutung der Expression einzelner MDR assoziierter Proteine, wie z.B. dem P-Glykoprotein in Hinsicht auf Prognose und Therapieerfolg der Behandlung, sind noch in der Diskussion. Es existieren widersprüchliche Studien zur Korrelation der in vivo/in vitro Expression von PGP zur klinisch evident bestehenden Chemoresistenz, so wie bei der CLL durchgeführten Untersuchung (Ito 1989). Im Gegensatz dazu fanden sich enge Korrelationen u.a. bei Ovarialtumoren (Bell 1985), Sarkomen (Gerlach 1987) oder lymphoblastischer Leukämie (Ma 1987).

Zweifelsfrei zeigt das MDR1 Genprodukt eine enge Assoziation mit chemoinsensiblen Tumoren wie Myelomen, Lymphomen, Mamma- und Ösophguskarzinomen (Fojo 1987; Goldstein 1989). Bei Kindern mit Sarkomen, die traditionell eine sensitive Tumorart darstellen, konnte bei allen Rezidiven eine PGP Expression festgestellt werden (Gerlach 1987). Schwieriger ist es, den Einfluß des PGP auf die Behandlung des Mammakarzinomes nachzuweisen, da die Kombinationstherapie mit nicht MDR Therapeutika eine Analyse des PGP Effektes erschwert. Es konnte aber eine Korrelation zwischen

Lymphknotenbeteiligung und dem Ausgang der Chemotherapie in Hinsicht auf die Bildung von PGP offengelegt werden (Schneider 1989; Ro 1990)

Eine vorläufige Studie an mehr als 400 verschiedenen menschlichen Tumoren zeigt eine weitverbreitete Expression des MDR1 Gens sowohl bei intrinsischer als auch erworbener Vielfachresistenz (Goldstein 1989). Die intrinsische Expression von MDR1 ist in malignen Neoplasien von Niere, Leber, Kolon und Nebenniere nachweisbar (Fojo 1987; Kakehi 1988). Im Fall der Nierenzellkarzinome wurde eine Erhöhung der MDR1-mRNA insbesondere bei differenzierten Tumoren gefunden, als ein Hinweis auf die Verbindung von MDR1 Expression und Differenzierungsgrad (Kanamaru 1989).

Verschiedene andere Tumoren weisen hohe Spiegel von MDR1-RNA auf, wobei es sich häufig um Neoplasien handelt, deren ursprüngliche Ausgangsgewebe keine größere MDR1 Expression zeigen. Dazu gehören akute und chronische Leukämien bei Kindern und Erwachsenen (Sato 1990; Rothenberg 1989; Herweijer 1990), Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (Lai 1989), Neuroblastome (Goldstein 1990; Bourhis 1989), non-Hodgkin Lymphome, Sarkome und Astrozytome (Goldstein 1989). Im Fall von Neuroblastom und Sarkom im Kindesalter besteht eine enge Korrelation zwischen der PGP Expression und schlechter Prognose, einschließlich des Nichtansprechens der Chemotherapie (Chan 1990).

Die Beobachtung, daß die PGP-Synthese bei Tumoren deren Ursprungsgewebe nicht MDR1 exprimieren führte zu der Vermutung, daß die maligne Transformation per se das MDR1 Gen aktivieren kann. Bestätigung für diese Überlegung fand sich in einer Studie, in der der MDR1-Promotor durch *ras* und *p53* stimuliert werden konnte, zwei Genen die gewöhnlich mit Tumorprogression assoziiert sind (Chin 1992).

Ungeachtet des kurzen Zeitraumes seit Entdeckung des vielfachresistenzassoziierten Proteins wachsen die Erkenntnisse über die Rolle und Wichtigkeit in der klinischen Praxis stetig. Dies gilt insbesondere für die Aussagekraft von MRP als prognostischer Faktor oder als mögliches Ziel für eine pharmakologische Reversion der Resistenzentwicklung.

Hohe Spiegel von MRP-mRNA wurden charakteristischerweise in Tumoren

gefunden, die gewöhnlich schlecht auf eine Chemotherapie ansprechen, wie etwa bei Bronchialkarzinomen (Nooter 1996) oder Neuroblastomen, letztere auch mit einer signifikanten Korrelation mit der Expression von n-myc, einem Onkogen, welches z.Z. den stärksten Indikator für ein Therapieversagen darstellt (Bordow 1994). Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß eine enge Beziehung zwischen zellulären Prozessen der Tumorprogression und der Ausbildung von Faktoren der Chemoresistenz besteht.

Mehrere Studien konnten belegen, daß bei schrittweiser Selektion zur Chemoresistenz in erster Linie MRP bei niedrigeren Konzentrationen zu finden ist, als PGP; ein möglicher Hinweis darauf, daß die Expression von MRP in geringen, klinisch relevanten Resistenzstufen stärker ausschlaggebend ist (Brock 1995).

Schließlich findet sich MRP häufig in verschiedenen Leukämieformen. Eine interessante Beobachtung konnte an der seltenen Subklasse M4Eo der akuten myeloischen Leukämie gemacht werden. Dort fand sich eine Deletion eines der MRP Allele, verbunden mit einem deutlich verlängerten, rückfallfreien Intervall nach primärer Therapie (Kuss 1994).

5.4.2 Pharmakologische Resensibilisierung von Chemoresistenz

In den letzten zehn Jahren sind zahlreiche Substanzen gefunden worden, die den PGP vermittelten Auswärtstransport der Chemotherapeutika zu inhibieren vermögen. Die sogenannten Modulatoren des MDR oder Chemosensitizer verteilen sich auf eine breite Varietät von Substanzen wie Kalziumkanalblocker, einige Dihydropyridine, Amiodaron, Steroide, Cyclosporin, Chinin u.a. (Überblick in Ecker 1995). Einige dieser Agenzien konnten in Phase I und II der klinischen Prüfung eintreten. Erste Ergebnisse zeigen, daß sich damit eine Beeinflussung der MDR in vivo zwar erreichen läßt, allerdings für den Preis regelmäßig auftretender erheblicher Nebenwirkungen (Raderer 1993). Im allgemeinen gilt, daß die

Modulatoren in sehr viel höheren als in deren ursprünglichen therapeutischen Dosen appliziert werden müssen.

Bei der Suche nach Chemosensitivern bei nicht PGP expremierenden Zelllinien, deren Resistenz auf das Vorhandensein von MRP zurückzuführen ist, sind ebenfalls diverse Modulatoren bekannt. Dazu gehören: Verampamil, Dihydropyridin, Tiapamil Analoge, der Bisindolylmaleimid Protein C Kinase Inhibitor und zahlreiche weitere Substanzen (Überblick in Loe 1996). Einige dieser Stoffe bewirken eine Revision der Chemosensibilität erst in Konzentrationen, die eine therapeutische Anwendung verbieten. Außerdem kann das Maß der Revision stark zwischen den einzelnen Zelllinien, ja sogar in einer einzelnen variieren.

Die Fähigkeit von MRP, Substrate nach Bindung mit Gluthation zu transportieren, führte zu Versuchen die intrazellulären Spiegel von GSH zu beeinflussen. Experimentell wird dazu Buthionin Sulphoximin eingesetzt. Damit konnte bei einigen Tumorzelllinien eine Resensibilisierung erreicht werden (Loe 1996).

5.4.3 Ausblick

Aus onkologischer Sicht gelten chemoresistente Zellen als abnorme Zellen, die den Therapieerfolg verhindern. Man erlangt den Eindruck, als ob die resistente Zelle immer der „mutierte“ und die sensitive immer der „normale“ Phänotyp ist. Dagegen wendet Harris ein, daß die meisten natürlichen Gewebe recht widerstandsfähig gegenüber der Chemotherapie sind. Es ist daher auch nicht verwunderlich, daß Tumoren die aus diesen Geweben erwachsen in der Regel eine Chemoresistenz zeigen. Letztlich bedarf es nur der Aktivierung von 3-7 Onkogenen um aus normalen Zellen Tumorzellen zu machen. Geht man davon aus, daß das menschliche Genom etwa 100000 Gene enthält, so ist die Tumorzelle -aus genetischer Sicht- zu 99,99% normal, zumindestens initial.

Die logische Konsequenz daraus scheint in der provokativen These von Harris zu bestehen, daß die „normale“ Tumorzelle chemosensibel, bis zu ihrer Mutation, ist (Harris 1985).

Dabei ist die Chemoresistenz das zentrale Problem in der Krebsbehandlung, insbesondere bei den disseminierten Tumoren die in der Regel nicht für einen chirurgischen oder strahlentherapeutischen Ansatz geeignet sind.

Auch wenn die Resistenzmechanismen in Untersuchungen präzisiert werden können, ist es nicht unproblematisch von diesen Ergebnissen auf den klinischen Patienten zu extrapolieren: Zellen in Kultur fehlt die funktionelle Enbindung in das Gewebe, sie sind meist weniger heterogen als im soliden Tumor und es ist nicht zu erwarten, daß sie dort ähnlich homogen vom Chemotherapeutikum ausgesetzt sind, wie es in vitro der Fall ist.

Trotz dieser Schwierigkeiten finden die Ergebnisse auf diesem Gebiet jetzt schon Anwendung, so z.B. als klinischer Marker zur Vorhersage des Ansprechens eines Therapieregimes. Letztendlich bleibt zu hoffen, daß weitere Erkenntnisse zu einer Überwindung der Chemoresistenz, sei es durch Unterbindung der die Chemoresistenz auslösenden Faktoren oder sei es durch gezielte Entwicklung eines Therapeutikums, das kein Substrat für den Resistenzmechanismen darstellt, führen.

6 Zusammenfassung

Bei der Behandlung disseminierter maligner Neoplasien ist die Chemotherapie mit Hilfe zytostatisch oder zytotoxisch wirksamer Substanzen oftmals die einzige Therapiestrategie mit Aussicht auf Erfolg. Therapielimitierend ist jedoch häufig die Manifestation einer Chemoresistenz, die nicht nur gegen Vertreter einer Stoffklasse gerichtet ist, sondern meist ein breites Spektrum strukturell unterschiedlicher Substanzen einschließt. Dieses als Vielfachresistenz bekannte Phänomen liegt in erster Linie in der Expression zellulärer Proteine begründet, die vielfältig an der Beseitigung und Unschädlichmachung des Therapeutikums beteiligt sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, Unterschiede in der Expression auf Proteinebene von chemoresistenten, im Vergleich zur den parentalen Ausgangslinien zu finden, um so neue Faktoren zu detektieren, die mit dem chemoresistenten Phänotyp assoziiert sind.

Für meine Arbeit standen Zelllinien eines Fibrosarkomes und Mammakarzinomes, die *in vitro* gegen Mitoxantron selektioniert wurden und Zelllinien von Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und Kolonkarzinom zu Verfügung, die einerseits gegen Mitoxantron andererseits gegen Daunorubicin eine Resistenz entwickelt haben. Mit dem Extrakt der zellulären Proteine der parentalen wie auch resistenten Zellklone wurden mit Hilfe der zweidimensionalen Elektrophorese im immobilisierten pH-Gradienten Proteinkarten erstellt, die dann rechnergestützt verglichen wurden. Im Hinblick auf eine vermehrte Bildung eines Genproduktes wurden dann Proteinspots, die sich in den resistenten Zelllinie als überexprimiert darstellten, der Sequenzierung zugeführt.

Insgesamt konnten in der zweidimensionalen Elektrophorese acht Proteine identifiziert werden, die in der Sequenzierung ein Ergebnis lieferten: sechs davon waren nicht in der Ausgangszelllinie vorhanden und bei zweien fand sich eine vermehrte Expression in der resistenten Zelllinie:

Zelllinie	Selektion	Protein Spot	Ergebnis der 2-D-Elektrophorese	Ergebnis der Sequenzierung
Magenkarzinom: EPG85-257RNOV	Mitoxantron	1003	Nicht in der Ausgangszelllinie vorhanden	Thioredoxin (TRX)
Magenkarzinom: EPG85-257RNOV/ EPG85-257RDB	Mitoxantron/Daunorubicin	2001	Nicht in der Ausgangszelllinie vorhanden	Annexin-1
Kolonkarzinom: HT29RNOV	Mitoxantron	3201	Nicht in der Ausgangszelllinie vorhanden	Adenin Phosphoribosyltransferase
Kolonkarzinom: HT29RDB	Daunorubicin	105	Nicht in der Ausgangszelllinie vorhanden	BCSG-1
Pankreaskarzinom: EPP85-181RNOV	Mitoxantron	6002	Nicht in der Ausgangszelllinie vorhanden	Fettsäurebindendes Protein (FABP)
Pankreaskarzinom: EPP85-181RNOV	Mitoxantron	205	Hochregulation	Stratifin
Pankreaskarzinom: EPP85-181RNOV/ EPP85-181RDB	Mitoxantron/Daunorubicin	6000	Hochregulation	Cofilin
Fibrosarkom: EPF86-079RNOV	Mitoxantron	1202	Nicht in der Ausgangszelllinie vorhanden	RHO-GDP Dissoziationsinhibitor-□

Besondere Erwähnung soll die Darstellung von Thioredoxin (TRX) in der mitoxantronresistenten Magenkarzinomzelllinie finden. Thioredoxin ist in einer Vielzahl biologischer Systeme integriert, wie Signaltransduktion, Genexpression und Zellproliferation. Es ist identisch mit dem autokrinen Wachstumsfaktor ADF für T-Lymphozyten. Seine Redoxaktivität ist entscheidend für die proliferationssteigernde Wirkung, denn mit TRX transfizierte Zellen zeigen ein vermehrtes Wachstum und eine verminderte Apoptose in vivo und vitro. Thioredoxin rückt damit als pharmakodynamischer Angriffspunkt in das Interesse einer medikamentösen Beeinflussung im Hinblick auf eine Resensibilisierung oder eines komplett neuen Ansatzes für künftige Chemotherapeutika.

Einen Einfluß in die Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose sind für

Annexin-1, Stratifin, Cofilin und den RHO-GDP-Dissoziationsinhibitor- β vorbeschrieben und bekannt. Insbesondere letztere sind dahingehend beschrieben worden Einfluß auf die Verhinderung der Apoptose zu haben, ein im Hinblick auf den Mechanismus der Chemoresistenz wichtiger Aspekt.

Für das im Pankreaskarzinom detektierte fettsäurebindende Protein ist es denkbar, daß es -in Anlehnung an die unspezifischen Transportproteine der Vielfachresistenz- am Auswärtstransport der Chemotherapeutika beteiligt ist.

Die Rolle von BCSG-1 ist noch unklar, allerdings ist diese Protein auch erstmalig vor zwei Jahren beschrieben worden; daher ist über dessen Rolle und Funktion in der Zellphysiologie nur ungenügend bekannt.

Es ergibt sich daraus die Notwendigkeit, die Relevanz der aus der zweidimensionalen Elektrophorese gewonnenen Ergebnisse durch andere Verfahren zu überprüfen, und deren genauen Einfluß zur Ausbildung des chemoresistenten Phänotyps zu charakterisieren.

7 Abkürzungen

5FU	5- Fluorouracil
ACT-D	Actionomycin
ara-C ³	Cytosin Arabinoside
ASK-1	Apoptosesignal-regulierende-Kinase-1
BCSG-1	Brustkrebsspezifisches Gen
BSO	Buthionin sulfoximin
CFTR	transmembranärer Konduktans Regulator der Cystischen Fibrose
CRtBP	Retinolbindenes Protein
DHFR	Dihydrofolat Reduktase
DTT	1,4-Dimercaptobuten-2,3-Diol
FABP	Fettsäurebindendes Protein
FH2	Dihydrofolsäure
FH4	Tetrahydrofolsäure
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxydiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GS-X-Pumpe	ATP-dependent glutathione S-conjugate efflux pump
hMTH1	menschlichen mutT Homologe
ICE	Interleukin-1 β -Konversionsenzym
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
LRP	Lung Resistance Protein
LTC4	Leukotrien C4

MDR	Multidrug Resistance
MGMT	O ⁶ -Alkylguanine-DNA-Alkyltransferase
MOAT	Multispezifischer organischer Anionentransporter
MRP	Multidrugresistance Related Protein
MTX	Methotrexat
NBD	Nukleotid bindene Domänen
O.D.	Optische Dichte
PGP	P-Glykoprotein
SDS	Natriumlauryl-sulfat
SUR	Sulfunylharnstoffrezeptor
TCR	Trichloressigsäure
Topo II	Topoisomerase II
TR	Thioredoxinreduktase
TRX	Thioredoxin

8 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Bryan 1995 Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W. et al.: Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. 1995: 268(5209): 423-426.
- Anderson 1978 Anderson, N.G., Anderson, N.L.: Analytical techniques for cell fractions. XXI. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple isoelectric focusing. *Anal. Biochem.* 1978: 85(2): 331-340 u. 341-354.
- Anderson 1982 Anderson, N.G., Anderson, L.: The Human Protein Index. *Clin. Chem.* 1982: 28(4 Pt 2): 739-748.
- Antonarakis 1998 Antonarakis, S.E., Aelst, L.: Mind the GAP, Rho, Rab and GDI. *Nature Genetics* 1998: 19: 106-108.
- Arrick 1984 Arrick, B.A., Nathan, C.F.: Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: A review. *Cancer Res.* 1984: 44: 4224-4232.
- Aubel 1984 Aubel-Sadron, G., Londos-Gagliardi, D.: Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie* 1984: 66(5): 333-352.
- Baas 1990 Baas F., Jongsma A.P., Broxterman H.J. et al.: Non-P-glycoprotein mediated mechanism for multidrug resistance precedes P-glycoprotein expression during in vitro selection for doxorubicin resistance in a human lung cancer cell line. *Cancer Res.* 1990: 50(17): 5392-5398.
- Babson 1981 Babson, J.R., Abell, N.S., Reed, D.J.: Protective role of the glutathione redox cycle against Adriamycin-mediated toxicity in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1981: 30: 2299-2304.
- Baker 1997 Baker, A., Payne, C.M. et al.: Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis. *Cancer Res.* 1997: 57: 5162-5167.
- Bakos 1996 Bakos, E., Hegedus, T., Hollo, Z. et al.: Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 1996: 271(21): 12322-12326.
- Barrand 1994 Barrand, M.A., Heppell-Parton, A.C., Wright, K.A. et al.: A 190-kilodalton protein overexpressed in non-P-glycoprotein-containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 1994: 86(2): 110-117.
- Bass 1993 Bass, N.M.: Cellular binding proteins of fatty acids and retinoids: similar or specialized functions? *Mol. Cell. Biochem.* 1993: 123: 1991-202.
- Batist 1986 Batist, G., Tulpule, A., Sinha, B.K. et al.: Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1986: 261: 15544.
- Bell 1985 Bell, D.R., Gerlach, J.H. et al.: Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* 1985: 3: 311-315.
- Bender 1975 Bender, R.A.: Membrane transport of methotrexate in human neoplastic cells. *Cancer Chemoth. Rep.* 1975: 6: 73-82.
- Bertino 1980 Bertino, J.R.: Approaches to drug selectivity in cancer therapy on the basis of differences between membranes of normal vs. neoplastic cells. *Adv. Pathobiol.* 1980: 7: 377-386.
- Bjellqvist 1982 Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G. et al.: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1982: 6(4): 317-339.

- Blose 1985 Blose, S.H., Hamburger, S.H.: Computer-analyzed high resolution two-dimensional gel electrophoresis: a new window for protein research. *Bio Techniques* 1985: May/June: 232-236.
- Bordow 1995 Bordow, S.B., Haber, M., Madafiglio, J. et al.: Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer Res.* 1994: 54: 5036-5040.
- Brownawell 1996 Bronawell, A.M., Creutz, C.E.: Calcium-dependent binding of the plasma protein Apolipoprotein A-1 to two members of the annexin family. *Biochemistry* 1996: 35: 6839-6845.
- Borst 1991 Borst, P.: Genetic mechanisms of drug resistance. A review. *Acta. Oncol.* 1991: 30(1): 87-105.
- Bourhis 1989 Bourhis, J., Benard, J., Hartmann, O. et al.: Correlation of *mdr1* gene expression with chemotherapy in neuroblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989: 81(18): 1401-1405.
- Bradley 1988 Bradley, G., Juranka, P.F., Ling, V.: Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1988: 948(1): 87-128.
- Brock 1995 Brock, I., Hipfner, D.R., Nielsen, B.S. et al.: Sequential coexpression of the multidrug resistance genes MRP and *mdr1* and their products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 1995: 55: 459-462.
- Broxterman 1988 Broxterman, H.J., Pinedo, H.M., Kuiper, C.K. et al.: Induction by verapamil of a rapid increase in ATP consumption in multidrug-resistant tumor cells. *FASEB J* 1988: 2: 2278-2282.
- Broxterman 1995 Broxterman, H.J., Giaccone, G., Lankelma, J.: Multidrug resistance proteins and other drug transport-related resistance to natural product agents. *Curr. Opin. Oncol.* 1995: 7(6): 532-540.
- Buller 1987 Buller, A.L., Clapper, M.L., Tew, K.D.: Glutathione S-transferases in nitrogen mustard-resistant and -sensitive cell lines. *Mol. Pharmacol.* 1987: 31(6): 575-578.
- Carlier 1997 Carlier, M.F., Laurent, V. et al.: Actin depolymerizing factor (ADF/Cofilin) enhances the Rate of filament turnover: Implication in actin-based motility. *J. Cell. Biol.* 1997: 136(6): 1307-1323.
- Chan 1990 Chan, H.S., Thorner, P.S., Haddad, G., Ling, V.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin. Oncol.* 1990: 8(4):689-704.
- Chiari 1989a Chiari, M., Casale, E., Santaniello, E., Rhighetti, P.G.: Synthesis of buffers for generating immobilized pH gradients. I: Acidic acrylamido buffers. *Appl. Theor. Electroph.* 1989: 1: 99-102.
- Chiari 1989b Chiari, M., Casale, E., Santaniello, E., Rhighetti, P.G.: Synthesis of buffers for generating immobilized pH gradients. II: Basic acrylamido buffers. *Appl. Theor. Electroph.* 1989: 1: 103-107.
- Chin 1992 Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 1992: 255: 459-462.
- Chong 1994 Chong, L.D. et al.: The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 1994: 79: 507-513.
- Chrambach 1973 Chrambach, A., Doerr, P., Finlayson, G.R., Miles, L.E., Sherins, R., Rodbard, D.: Instability of pH gradients formed by isoelectric focusing in polyacrylamide

gel. Ann. NY Acad.Sci. 1973: 209: 44-64.

- Chuman 1996 E Chuman, Y., Sumizawa, T. et al.: Expression of the multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene in human colorectal, gastric and non-small-cell lung carcinomas. *Int. J. Cancer*. 1996: 66(2): 274-279.
- Cohen 1978 Cohen, M., Bender, R.A., Donehower, R.C., Myers, C.E., Chabner, B.A.: Reversibility of high-affinity binding of methotrexate in L1210 murine leukaemia cells. *Cancer Res*. 1978: 38: 866-870.
- Cohen 1995 Cohen, B.E., Lee, G. et al.: Cyclic 3'-5'-adenosine monophosphate binds to annexin I and regulates calcium-dependent membrane aggregation and ion channel activity. *FEBS-Lett*. 1995: 377(3): 444-450.
- Cole 1992a Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H. et al.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992: 258(5088): 1650-1654.
- Cole 1992b Cole, S.P.C., Pinkoski, M.J. et al.: Elevated expression of annexin II (lipocortin II, p36) in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Br. J. Cancer* 1992: 65(4): 498-502.
- Cole 1993 Cole, S.P.C., Deeley, R.G.: Multidrug resistance-protein: sequenz correction. *Science* 1992: 258: 879.
- Cole 1994 Cole, S.P.C., Sparks, K.E., Fraser, K., Loe, D.W., Grant, C. E. et al.: Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res*. 1994: 54: 5902-5910.
- Cornwell 1986 Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., Pastan, I.: Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug-resistant KB cells. *J. Biol. Chem*. 1986: 261: 7921-7928.
- Cornwell 1987 Cornwell, M.M., Tsudo, T., Gottesman, M.M., Pastan, I.: ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug-resistant KB cells. *FASEB J*. 1987: 1: 51-54.
- Crespi 1986 Crespi, M.D., Ivanier, S.E., Genovese, J., Baldi, A.: Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1986: 136(2): 521-528.
- Dale 1969 Dale, G., Latner, A.L.: Isoelectric focusing of serum proteins in acrylamide gels followed by electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*. 1969: 24(1): 61-68.
- Danley 1996 Danley, D.E., Chuang, T.H., Bokoch, G.M.: Defective Rho GTPase regulation by IL-1 beta-converting enzyme-mediated cleavage of D4 GDP dissociation inhibitor. *J. Immunol*. 1996: 157(2): 500-503.
- Dano 1973 Dano, K.: Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1973: 323(3): 466-483.
- Dellambra 1995 Dellambra, E., Patrone, M. et al.: Stratifin, a keratinocyte specific 14-3-3 protein, harbors a pleckstrin homology (PH) domain and enhances protein kinase C activity. *J. Cell. Sci*. 1995: 108 (Pt 11): 3569-3579.
- Demple 1985 Demple, B., Sedgwick, B., Robins, P. et al.: Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1985: 82(9): 2688-2692.
- Dietel 1987 Dietel, M., Arps, H. et al.: Establishment of primary cell cultures: experiences with 155 cell strains. *Klin. Wochenschr*. 1987: 65: 507-512.
- Dietel 1990 Dietel, M., Arps, H., Lage, H., Niendorf, A.: Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res*. 1990: 50: 6100-6106.
- Dreier 1998 Dreier, R., Schmid, K.W. et al.: Differential expression of annexin I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem. Cell Biol*. 1998:

110: 137-148.

- Dumenco 1989 Dumenco, L.L., Warman, B. et al.: Increase in nitrosourea resistance in mammalian cells by retrovirally mediated gene transfer of bacterial O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Res.* 1989: 49: 6044-6051.
- Durr 1983 Durr, F.E., Wallace, R.E. et al.: Molecular and biochemical pharmacology of mitoxantrone. *Cancer Treat. Rev.* 1983: 10 Suppl B: 3-11.
- Ecker 1995 Ecker, G., Chiba, P.: Structure-activity-relationship studies on modulators of the multidrug transporter P-glycoprotein-an overview. *Klin. Wochenschr* 1995: 107: 681-686.
- Eliopoulos 1995 Eliopoulos, A.G., Kerr, D.J. et al.: The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and bcl-2. *Oncogene* 1995: 11: 1217-1228.
- Eijdemans 1995 Eijdemans, E.W.H.M., De Haas, M., Covo-Martin, J.M.: Mechanisms of MRP over-expression in four human lung-cancer cell lines and analysis of the MRP amplicon. *Int. J. Cancer* 1995: 60: 676-684.
- Fan 1994 Fan, D., Poste, G., Seid, C., Earnest, L.E., Bull, T., Clyne, R.K., Fidler, I.J.: Reversal of multidrug resistance in murine fibrosarcoma cells by thioxanthene flupentixol. *Invest. New Drugs* 1994: 12(3): 185-195.
- Ferrando 1996 Ferrando, A.A., Velasco, G. et al.: Cloning and expression analysis of human bleomycin hydrolase, a cysteine proteinase involved in chemotherapy resistance. *Cancer Res.* 1996: 56: 1746-1750.
- Flower 1994 Flower, R.J., Rothwell, N.J.: Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994: 15(3): 71-76.
- Fojo 1987 Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J.: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987: 85: 265-269.
- Friedberg 1985 Friedberg, E.C.: *DNA Repair*. NY 1985.
- Futscher 1994 Futscher, B.W., Abbaszadegan, M.R., Domann, F., Dalton, W.S.: Analysis of MRP mRNA in mitoxantrone-selected, multidrug-resistant human tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 1994: 47(9): 1601-1606.
- Garrels 1989 Garrels, J.I.: The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. *J. Biol. Chem.* 1989: 264: 5269-5282.
- Gasdaska 1994 Gasdaska, P.Y., Oblong, J.E. et al.: The predicted amino acid sequence of human thioredoxin is identical to that of the autocrine growth factor human adult T-cell derived factor (ADF): thioredoxin mRNA is elevated in some human tumors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994: 1218(3): 292-296.
- Gaveby 1988 Gaveby B.M., Pettersson P., Andrasko J., Ineva-Flygare L. et al.: Stable storage conditions of immobilized chemicals for isoelectric focusing. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1988: 16(2-3): 141-164.
- Gaveby 1988 Gaveby, B.M. et al.: Stable storage conditions of immobilized chemicals for isoelectric focusing. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1988: 16: 141-164.
- Geier 1994 Geier, A., Hemi, R., Haimsohn, M., Beery, R. et al.: Epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1 protect MDA-231 cells from death induced by Actinomycin D: The involvement of growth factors in drug resistance. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1994: 30A: 336-343.
- Gelfi 1984 Gelfi, C., Righetti, P.G.: Swelling kinetics of immobilized gels for isoelectric focussing. *Electrophoresis* 1984: 5: 257-262.
- Gelfi 1987 Gelfi, C., Bossi, M.L., Bjellqvist, B., Righetti, P.G.: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the pH 10-11 range. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1987: 15(1): 41-48.

- Gerlach 1986 Gerlach, J.H., Kartner, N., Bell, D.R., Ling, V.: Multidrug resistance. *Cancer Surv.* 1986: 5(1): 25-46.
- Gerlach 1987 Gerlach, J.H., Bell, D.R. et al.: P-glycoprotein in human sarcoma: evidence for multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* 1987: 5(9): 1452-1460.
- Glatz 1997 Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.O. et al.: Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* 1997: 57(1): 3-9.
- Glisson 1987 Glisson, B.S., Ross, W.E.: DNA topoisomerase II: a primer on the enzyme and its unique role as a multidrug target in cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* 1987: 32(2): 89-106.
- Goldenberg 1969 Goldenberg, G.J.: Properties of L5178Y lymphoblasts highly resistant to nitrogen mustard. *Ann. NY Acad. Sci.* 1969: 163: 936-953
- Goldie 1980 Goldie, J.H., Krystal, G., Hartley, D. et al.: A methotrexate insensitive variant of folate reductase present in two lines of methotrexate-resistant L5178Y cells. *Eur. J. Cancer* 1980: 16(12): 1539-1546.
- Goldman 1978 Goldman, I.D., Lichtenstein, N.S., Oliverio, V.T.: Carrier-mediated transport of the folic acid analogue methotrexate in the L1210 leukaemia cell. *J. Biol. Chem.* 1978: 243: 5007-5017.
- Goldstein 1989 Goldstein, L.J., Galski, H., Fojo, A.T., Willingham, M., Lai, S.L., Gazdar, A., Pirker, R. et al.: Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989: 81(2): 116-124.
- Goldstein 1990 Goldstein, L.J., Fojo, A.T., Ueda, K., Crist, W., Green, A., Brodeur, G., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Expression of the multidrug resistance, MDR1, gene in neuroblastomas. *J. Clin. Oncol.* 1990: 8(1): 128-136.
- Gomi 1997 Gomi, A., Masuzawa, T., Ishikawa, T., Kuo, M.T.: Posttranscriptional regulation of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase expression by 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea and by cycloheximide in human glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997: 239(1): 51-56.
- Gonsalvez 1974 Gonsalvez, M., Blanco, M., Hunter, J., Miko, M., Chanhce, B.: Effects of anticancer agents on the respiration of isolated mitochondria and tumour cells. *Eur. J. of Cancer* 1974: 10: 567-574.
- Görg 1988 Görg, A., Postel, W., Günther, S.: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH Gradients. *Electrophoresis* 1988: 9: 531-546.
- Gors 1986 Gros, P., Croop, J., Robinson, I., Varshavsky, A., Hausman, D.E.: Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug resistant hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986: 83: 337-341.
- Grant 1994 Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R. et al.: Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* 1994: 54(2): 357-361.
- Grosse 1995 Grosse, R., Zschiesche, W. et al.: Mammary-derived growth inhibitor (MDGI): a new differentiation factor involved in breast cancer progression. *Hormones and Growth Factors in Development and Neoplasia, Fogarty International Conference, June 26-28, 1995*: 14.
- Gurtoo 1981 Gurtoo, H.L., Hipkens, J.H., Sharma, S.D.: Role of glutathione in the metabolism-dependent toxicity and chemotherapy of cyclophosphamide. *Cancer Res.* 1981: 41: 3584-3591.
- Hall 1998 Hall, A.: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998: 279: 509-514.

- Hamada 1988 Hamada, H., Okochi, E., Watanabe, M., Oh-hara, T. et al.: Mr 85,000 membrane protein specifically expressed in adriamycin-resistant human tumor cells. *Cancer Res.* 1988: 48(24 Pt 1): 7082-7087.
- Harker 1989 Harker, W.G., Slade, D.L., Dalton, W.S., Meltzer, P.S. et al.: Multidrug resistance in mitoxantrone-selected hl-60 leukemia cells in the absence of p-glycoprotein overexpression. *Cancer Res.* 1989: 49(16): 4542-4549.
- Harker 1991 Harker, W.G., Slade, D.L. et al.: Mitoxantrone resistance in HL-60 leukemia cells: reduced nuclear topoisomerase II catalytic activity and drug-induced DNA cleavage in association with reduced expression of the topoisomerase II beta isoform. *Biochemistry* 1991: 30(41): 9953-9961.
- Harris 1985 Harris, A.L.: DNA repair and resistance to chemotherapy. *Cancer Surv.* 1985: 4: 601-624.
- Hayes 1990 Hayes, J.D., Wolf, C.R.: Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* 1990: 272(2): 281-295.
- Henderson 1984 Henderson, G.B., Zevely, E.M.: Transport routes utilized by L1210 cells for influx and efflux of methotrexate. *J. Biol. Chem.* 1984: 254: 1526-1531.
- Hermeking 1997 Hermeking, H., Lengauer, C. et al.: 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell.* 1997: 1(1): 3-11.
- Herweijer 1990 Herweijer, H., Sonneveld, P., Baas, F., Nooter, K.: Expression of *mdr1* and *mdr3* multidrug-resistance genes in human acute and chronic leukemias and association with stimulation of drug accumulation by cyclosporine. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990: 82(13): 1133-1140.
- Hill 1979 Hill, B.T., Bailey, B.D., White, J.C., Goldman, I.D.: Characteristics of transport of 4-amino antifolates and folate compounds by two cell lines of L5178Y lymphoblasts, one with impaired transport of methotrexate. *Cancer Res.* 1979, 39: 2440-2446.
- Hill 1995 Hill, C.S. et al.: The Rho family GTPase RhoA, Rac1, and Cdc42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 1995: 81: 1159-1170.
- Hirono 1961 Hirono, I.: Mechanism of natural and acquired resistance to methyl-bis(4-chlorethyl)-amine N-oxide in ascites tumors. *Gann.* 1961: 52: 39-48.
- Hohoff 1998 Hohoff, C., Spener, F.: Fatty acid binding proteins and mammary growth inhibitor. *Fett/Lipid* 1998: 100: 252-263.
- Holm 1989 Holm, C., Stearns, T., Botstein, D.: DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. *Mol. Cell. Biol.* 1989: 9: 159-168.
- Horio 1988 Horio, M., Gottesman, M.M., Pastan, I.: ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988: 85(10): 3580-3584.
- Ito 1989 Ito, Y., Tanimoto, M. et al.: Increased P-glycoprotein expression and multidrug-resistant gene (*mdr1*) amplification are infrequently found in fresh acute leukemia cells. Sequential analysis of 15 cases at initial presentation and relapsed stage. *Cancer* 1989: 63(8): 1534-1538.
- Ito 1997 Ito, K., Suzuki, H., Hirohashi, T., Kume, K., Shimizu, T., Sugiyama, Y.: Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am. J. Physiol.* 1997: 272(1 Pt 1): G16-22.
- Izquierdo 1996a Izquierdo, M.A., Shoemaker, R.H., Flens, M.J., Scheffer, G.L., Wu, L. et al.: Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer-cell lines. *Int. J. Cancer* 1996: 65(2): 230-237.
- Izquierdo 1996b Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J. et al.: Broad distribution of the

- multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am. J. Pathol.* 1996: 148(3): 877-887.
- Jansen 1989 Jansen, G., Westerhof, G.R., Kathmann, I., Rademaker, B.C., Rijksen, G., Schornagel, J.H.: Identification of a membrane-associated folate-binding protein in human leukemic CCRF-CEM cells with transport-related methotrexate resistance. *Cancer Res.* 1989: 49: 2455-2459.
- Jedlitschky 1996 Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U. et al.: Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* 1996: 56(5): 988-994.
- Ji 1997 Ji, H., Liu, Y.E. et al.: Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res.* 1997: 57(4): 759-764.
- Judson 1992 Judson, I.R.: Understanding anticancer drug resistance: opportunities for modulation and impact on new drug design. *Eur. J. Cancer* 1992: 28(1): 285-289.
- Juliano 1976 Juliano, R.L., Ling, V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1976: 455(1): 152-162.
- Jungblut 1996 Jungblut, P., Thiede, B. et al.: Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electroph.* 1996: 17: 839-847.
- Takehi 1988 Takehi, Y., Kanamaru, H., Yoshida, O., Ohkubo, H., Nakanishi, S. et al.: Measurement of multidrug-resistance messenger RNA in urogenital cancers; elevated expression in renal cell carcinoma is associated with intrinsic drug resistance. *J. Urol.* 1988: 139(4): 862-865.
- Kanamaru 1989 Kanamaru, H., Takehi, Y., Yoshida, O. et al.: Mdr1 RNA levels in human renal cell carcinomas correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989: 81(11): 844-849.
- Katzmann 1995 Katzmann, D.J., Hallstrom, T.C., Voet, M., Wysock, W. et al.: Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1995: 15(12): 6875-6883.
- Kaye 1995 Kaye, S.B.: Clinical drug resistance: the role of factors other than P-glycoprotein. *Am. J. Med.* 1995: 99(6A): 40S-44S.
- Kelley 1988 Kelley, S.L., Basu, A., Teicher, B.A., Hacker, M.P., Hamer, D.H., Lazo, J.S.: Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 1988: 241(4874): 1813-1815.
- Kessel 1968 Kessel, D., Botterill, V., Wodinsky, I.: Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response. *Cancer Res.* 1968: 28(5): 938-941.
- Kessel 1969 Kessel, D., Hall, T.C., Rosenthal, L.E.: Uptake and phosphorylation of cytosine arabinoside by normal and leukaemic human blood cells in vitro. *Cancer Res.* 1969; 29: 459-463.
- Keyomarsi 1986 Keyomarsi, K., Moran, R.G.: Folic acid augmentation of effects of fluoropyrimidines on murine and human leukaemic cells. *Cancer Res.* 1986: 46: 5229-5233.
- Klose 1975 Klose, J.: Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975: 26(3): 231-243.
- Klose 1995 Klose, J., Kobalz, U.: Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated

protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995; 16: 1034-1059.

- Kool 1997 Kool, M., de-Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van-Eijk, M.J. et al.: Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1997; 57(16): 3537-3547.
- Khosravi-Far 1995 Khosravi-Far, R. et al.: Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15: 6443-6453.
- Kramer 1988 Kramer, R.A., Zakher, J., Kim, G.: Role of the glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug resistance. *Science* 1988; 241(4866): 694-697.
- Kule 1994 Kule, C., Ondrejickova, O., Verner, K.: Doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone cytotoxicity in yeast. *Molecular Pharmacology.* 1994; 46(6): 1234-1240.
- Kuss 1994 Kuss, B.J., Deely, R.G., Cole, S.P.C. et al.: Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukaemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications. *Lancet* 1994; 343: 1531-1534.
- Lage 1998 Lage, H.: Atypische Multidrug-Resistenz, *Arzneimitteltherapie* 1998 im Druck
- Lai 1989 Lai, S.L., Goldstein, L.J., Gottesman, M.M., Pastan, I. et al.: Mdr1 gene expression in lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989; 81(15):1144-1150.
- Lamaze 1996 Lamaze, C. et al.: Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 1996; 382: 177-179.
- Laudanna 1996 Laudanna, C. et al.: Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 1996; 271: 981-983.
- Leffers 1993 Leffers, H., Madsen, P., et al.: Molecular cloning and expression of the transformation sensitiv epithelial marker stratifin. *J. Mol. Biol.* 1993; 231: 982-998.
- Leier 1994 Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U. et al.: The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(45): 27807-27810.
- Ling 1974 Ling, V., Thompson, L.H.: Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell. Physiol.* 1974; 83(1): 103-116.
- Loe 1996 Loe, D.W., Deeley, R.G., Cole, S.P.: Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A(6): 945-957.
- Lown 1985 Lown, J.W., Morgan, A.R., Yen, S.F., Wang, Y.H., Wilson, W.D.: Characteristics of the binding of the anticancer agents mitoxantrone and ametantrone and related structures to deoxyribonucleic acids. *Biochemistry* 1985; 24(15): 4028-4035.
- Ma 1987 Ma, D.D.F., Scurr, R.D., Davey, R.A., Mackertich, S.M., Harman, D.H., Dowden, G. et al.: Detection of a multidrug resistant phenotype in acute non-lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1987; 1: 135-137.
- Ma 1996 Ma, A.S., Ozers, L.J.: Annexins I and II show differences in subcellular localization and differentiation-related changes in human epidermal keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 1996; 288(10): 596-603
- Macko 1969 Macko, V., Stegemann, H.: Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis identification of varieties. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 1969; 350(7): 917-919.
- Malcom 1994 Malcom, K.C. et al.: Activation of rat liver phospholipase D by the small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 25951-25954.

- Margolis 1969 Margolis, J., Kenrick, K.G.: 2-dimensional resolution of plasma proteins by combination of polyacrylamide disc and gradient gel electrophoresis. *Nature* 1969: 221(185): 1056-1057.
- Maruta 1997 Maruta, H.: F-actin cappers. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1997: 24(11): 1442-1447.
- Masaki 1996 Masaki, T., Tokuda, M. et al.: Enhanced expression of the protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996: 24(1): 72-81.
- Masouyé 1997 Masouyé, I., Hagens, G. et al.: Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein. *Circ. Res.* 1997: 81(3): 297-303.
- Mau 1992 Mau, B.L., Powis, G.: Inhibition of cellular thioredoxin reductase by diaziquone and doxorubicin. Relationship to the inhibition of cell proliferation and decreased ribonucleotide reductase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1992: 43(7): 1621-1626.
- Mazzoni 1990 Mazzoni, A., Trave, F., Russo, P. Nicolin, A., Rustum, Y.M.: Generation and characterization of a low-degree drug-resistant human tumor cell line. *Oncology* 1990: 47: 488-497.
- McGough 1997 McGough, A., Pope, B., Chiu, W., Weeds A.: Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell. Biol.* 1997: 138(4): 771-781.
- McGrath 1988 McGrath, T., Center, M.S.: Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: evidence that a surface membrane protein distinct from p-glycoprotein contributes to reduced cellular accumulation of drug. *Cancer Res.* 1988: 48: 3959-3963.
- Meister 1988 Meister, A.: Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 1988: 263: 17205-17208.
- Melki 1994 Melki, V., Hullin, F. et al.: Annexin I as a potential inhibitor of insulin receptor protein tyrosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994: 203(2): 813-819.
- Meyer 1993 Meyer, M., Schreck, R. Baeuerle, P.A.: H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as a secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 1993: 12(5): 2005-2015.
- Mirski 1987 Mirski, S.E.L., Gerlach, J.H., Cole, S.P.C.: Multidrug resistance in a small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res.* 1987: 47: 2594-2598.
- Moffat 1994 Moffat, G.J., McLaren, A.W., Wolf, C.R.: Involvement of jun and fos proteins in regulation transcriptional activation of the human pi class glutathione S-transferase gene in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1994: 269: 16397-16402.
- Moran 1979 Moran, R.G., Mulkins, M., Heidelberger, C.: Role of thymidylate synthetase activity in development of methotrexate cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979: 76: 5924-5928.
- Moorman 1996 Moorman, J.P. et al.: Inactivation of the small GTP binding protein Rho induces multinucleate cell formation and apoptosis in murine T lymphoma EL4. *J. Immunol.* 1996: 156: 4146-4153.
- Morrow 1990 Morrow, C.S., Cowan, K.H.: Glutathione S-transferases and drug resistance. *Cancer Cells* 1990: 2(1): 15-22.
- Muller 1994 Muller, M., Meijer, C., Zaman, G.J.R., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, H. et al.: Overexpression of the gene encoding multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994: 91: 13033-13037.

- Naundorf 1995 Naundorf, H., Zschiesche, W. et al.: Influence of liposomes rich in unsaturated or saturated fatty acids on the growth of human xenotransplanted mammary carcinomas and on the levels of heart type fatty acid binding protein. *In Vivo* 1995: 9(3): 247-251.
- Nebi 1996 Nebi, G., Meuer, S.C., Samstag, Y.: Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J. Biol. Chem.* 1996: 271(42): 26276-26280.
- Neuhoff 1988 Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.: Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988: 9(6): 255-262.
- Nooter 1996 Nooter, K., Bosman, F.T., Burger, H. et al.: Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 1996: 7: 75-81.
- Nunberg 1978 Nunberg, J.H., Kaufman, R.J. et al.: Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homologically staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978: 75(11): 5553-5556.
- Oda 1996 Oda, Y., Schneider-Stock, R., Rys, J., Gruchala, A. et al.: Expression of multidrug-resistance-associated protein gene in human soft-tissue sarcomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1996: 122(3): 161-165.
- O'Farrell 1975 O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975: 250(10): 4007-21.
- Okamoto 1996 Okamoto, K., Toyokuni, S. et al.: Overexpression of human muT homologue gene messenger RNA in renal-cell-carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int. J. Cancer* 1996: 65: 437-441.
- Olson 1995 Olson, M.F. et al.: An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 1995: 269: 1270-1272.
- Ota 1995 Ota, E., Abe, Y., Oshika, Y., Ozeki, Y., Iwasaki, M., Inoue, H. et al.: Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 1995: 72(3): 550-554.
- Palmgren 1998 Palmgren, M.G., Fuglsang, A.T., Jahn, T.: Deciphering the role of 14-3-3 proteins. *Exp. Biol. Online* 1998: 3: 4.
- Papadopoulou 1994 Papadopoulou, B., Roy, G., Dey, S., Rosen, B.P., Ouellette, M.: Contribution of the Leishmania P-glycoprotein-related gene *ltgpgA* to oxanion resistance. *J. Biol. Chem.* 1994: 269(16): 11980-11986.
- Pastan 1987 Pastan, I., Gottesman, M.: Multiple drug resistance in human cancer. *N. Engl. J. Med.* 1987: 316: 1388-1393.
- Paulusma 1996 Paulusma, C.C., Bosma, P.J., Zaman, G.J., Bakker, C.T., Otter, M. et al.: Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 1996: 271(5252): 1126-1128.
- Pegg 1990 Pegg, A.E.: Mammalian O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* 1990: 50: 6119-6129.
- Perez 1990 Perez, R.P., Hamilton, T.C., Ozols, R.F.: Resistance to alkylating agents and cisplatin: Insights from ovarian carcinoma model systems. *Pharmacol. Ther.* 1990: 48(1): 19-27.
- Peters 1992 Peters, W.H., Roelofs, H.M.: Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 1992: 52(7): 1886-

1890.

- Powis 1998 Powis, G., Kirkpatrick, D.L. et al.: Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chem. Biol. Interact.* 1998: 111-112: 23-34.
- Pusztai 1993 Pusztai, L., Lewis, D.E., Lorenzen, J.: Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. *J. Path.* 1993: 169: 191-201.
- Rabilloud 1994 Rabilloud, T., Valette, C. et al.: Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in first dimension. *Electrophoresis* 1994: 15: 1-7.
- Raderer 1993 Raderer, M., Scheithauer, W.: Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. *Cancer* 1993: 72: 3553-3563.
- Rappa 1997 Rappa, G., Loico A., Flavell R.A., Sartorelli A.C.: Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as aco-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res.* 1997: 57: 5232-5237.
- Ray 1994 Ray, M.E., Guan, X.Y., Slovak, M.L., Trent, J.M., Meltzer, P.S.: Rapid detection, cloning and molecular cytogenetic characterisation of sequences from an MRP-encoding amplicon by chromosome microdissection. *Br. J. Cancer* 1994: 70: 85-90.
- Rhoads 1946 Rhoads, C.P.: Nitrogen mustards in treatment of neoplastic disease. *JAMA* 1946: 21: 656-658.
- Righetti 1983 Righetti, P.G.: Isoelectric focusing: Theory, methodology and applications. Amsterdam, NY, Oxford, Elsevier 1983.
- Righetti 1989 Righetti, P.G., Gianazza, E., Gelfi, C., Chiari, M., Sinha, P.: Isoelectric focusing in immobilized pH Gradients. *Analytical Chemistry* 1989: 61: 1602-1611.
- Riordan 1985 Riordan, J.R., Ling, V.: Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol. Ther.* 1985: 28(1): 51-75.
- Riordan 1989 Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R. et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989: 245(4922): 1066-1073.
- Ro 1990 Ro, J., Sakin, A., Ro, J.Y.: Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. *Hum. Pathol.* 1990: 21: 787-791.
- Rome 1995 Rome, L.H.: Multidrug resistance: Locked in the vault? *Nat. Med.* 1995: 1(6): 527.
- Ross 1979a Ross, W.E, Zwelling, L.A. et al.: Relationship between cytotoxicity and DNA strand breakage produced by adriamycin and other intercalating agents. *Int. J. of Radiation Onc., Biol.-Physics* 1979: 5: 1221-1224.
- Ross 1979b Ross, W.E, Glaubiger, D., Kohn, K.W.: Qualitative and quantitative aspects of intercalator-induced DNA strand breaks. *Biochemica and Biophysica Acta* 1979: 562: 41-50.
- Rothenberg 1989 Rothenberg, M.L., Mickley, L.A., Cole, D.E.: Expression of the *mdr-1/P-170* gene in patients with acute leukemia. *Blood* 1989: 74: 1388-1395.
- Rothenberg 1989 Rothenberg, M.L., Mickley, L.A., Cole, D.E., Balis, F.M. et al.: Expression of the *mdr-1-p-170* gene in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1989: 74(4): 1388-1395.
- Rutherford 1993 Rutherford, A.V., Willingham, M.C.: Ultrastructures localization of daunomycin in multidrug-resistant cultured cells with modulation of multidrug transporter. *J. Histochem. Cytochem.* 1993: 41: 1573-1577.
- Saitoh 1998 Saitoh, M., Nishitoh, H. et al.: Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of

- apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 1998; 17(9): 2596-2606.
- Sakamoto 1996 Sakamoto, T., Repasky, W.T. et al.: Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H₂O₂-treated rat thymocytes by lipocortin I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996: 220(3): 643-647.
- Samstag 1994 Samstag, Y., Eckerskorn, C. et al.: Costimulatory signals for human T-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994: 91(10): 4494-4498.
- Samstag 1996 Samstag, Y., Dreizler, E.M. et al.: Inhibition of constitutive serine phosphatase activity in T lymphoma cells results in phosphorylation of pp19/cofilin and induces apoptosis. *J. Immunol.* 1996: 156(11): 4167-4173.
- Sasaki 1998 Sasaki, T., Takai, Y.: The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998: 245(3): 641-645.
- Sato 1990 Sato, H., Gottesman, M.M., Goldstein, L.J., Pastan, I., Block, A.M., Sandberg, A.A., Preisler, H.D.: Expression of the multidrug resistance gene in myeloid leukemias. *Leuk. Res.* 1990: 14(1): 11-21.
- Scanlon 1989 Scanlon, K.J., Kashani-Sabet, M., Miyachi, H., Sowers, L.C., Rossi, J.: Molecular basis of cisplatin resistance in human carcinomas: model systems and patients. *Cancer Res.* 1989: 9: 1301-1312.
- Schadendorf 1995 Schadendorf, D., Makki, A., Stahr, C., van-Dyck, A., Wanner, R., Scheffer, G.L. et al.: Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma. *Am. J. Pathol.* 1995: 147(6): 1545-1552.
- Scheffer 1995 Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M. et al.: The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat. Med.* 1995: 1(6): 578-582.
- Schenk 1996 Schenk, H., Vogt, M. et al.: Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression. *J. Immunol.* 1996: 156(2): 765-771.
- Scheper 1993 Scheper, R.J. et al.: Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* 1993: 53: 1475-1479.
- Schilisky 1981 Schilisky, R.L., Bailey, B.D., Chabner, B.A.: Characteristics of membrane transport of methotrexate by cultured human breast cancer cells. *Bioch. Pharm.* 1981: 30: 1537-1542.
- Schneider 1989 Schneider, J., Bak, M., Efferth, T.: P-glycoprotein expression in treated and untreated human breast cancer. *Br. J. Cancer* 1989: 60: 815-818.
- Schuurhuis 1991 Schuurhuis, G.J. et al.: Early multidrug resistance, defined by changes in intracellular doxorubicin distribution, independent of P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* 1991: 64: 857-861.
- Seidel 1995 Seidel, A., Hasmann, M., Loser, R., Bunge, A., Schaefer, B., Herzig, I. et al.: Intracellular localization, vesicular accumulation and kinetics of daunorubicin in sensitive and multidrug-resistant gastric carcinoma EPG85-257 cells. *Virchows Arch.* 1995: 426(3): 249-256.
- Shapiro 1967 Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V. Jr.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967: 28(5): 815-820.
- Shen 1986 Shen, D.W., Fojo, A., Chin, J.E.: Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* 1986: 232: 643-645.
- Simon 1994 Simon, S.M., Schindler, M.: Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994: 91(9): 3497-3504.

- Simonsen 1983 Simonsen, C.C., Levinson, A.D.: Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983: 80(9): 2495-2499.
- Sinha 1987 Sinha, P.K., Righetti, P.G.: Isoelectric focusing of basic proteases in immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1987: 15(3-4): 199-206.
- Sirotnak 1981 Sirotnak, F.M., Moccio, D.M. et al.: Relative frequency and kinetic properties of transport-defective phenotypes among methotrexate-resistant L1210 clonal cell lines derived in vivo. *Cancer Res.* 1981: 41: 4447-4452.
- Sirotnak 1987 Sirotnak, F.M.: Determinants of resistance to antifolates: biochemical phenotypes, their frequency of occurrence and circumvention. *NCI Monogr.* 1987: 5: 27-37.
- Sklar 1991 Sklar, M.D., Prochownik, E.V.: Modulation of cisplatin resistance in friend erythroleukemia cells by c-myc. *Cancer Res.* 1991: 51: 2118-2123.
- Slovak 1993 Slovak, M.L., Ho, J.P., Bhardwaj, G., Kurz, E.U. et al.: Localisation of a novel multidrug resistance-associated gene in the HT1080/DR4 and H69AR human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1993: 53: 3221-3225.
- Smith 1990 Smith, P.J., Morgan, S.A. et al.: Mitoxantrone-DNA binding and the induction of topoisomerase II associated DNA damage in multi-drug resistant small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 1990: 40(9): 2069-2078.
- Soldan 1996 Soldan, M., Netter, K.J., Maser, E.: Induction of daunorubicin carbonyl reducing enzymes by daunorubicin in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells. *Biochem. Pharmacology* 1996: 51/2: 117-123.
- Sorof 1994 Sorof, S.: Modulation of mitogenesis by liver fatty acid binding protein. *Cancer Metastasis Rev.* 1994: 13(3-4): 317-336.
- Stutts 1992 Stutts, M.J., Chinnet, T.C., Mason, S.J., Fullton, J.M. et al.: Regulation of Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by extracellular ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992: 89(5): 1621-1625.
- Szczypka 1994 Szczypka, M.S., Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S., Thiele, D.J.: A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 1994: 269(36): 22853-22857.
- Takahashi 1997 Takahashi, K., Sasaki, T. et al.: Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J. Biol. Chem.* 1997: 272(37): 23371-23375.
- Takeuchi 1992 Takeuchi, N., Nakamura, T. et al.: Inhibitory effect of mitoxantron on activity of protein kinase C and growth of HL60 cells. *J. Biochem. Tokyo* 1992: 112(6): 762-767.
- Takikawa 1992 Takikawa, H., Arai, S., Yamanaka, M.: Binding of bile acids, organic anions, and fatty acids by bovine intestinal Z protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992: 292(1): 151-155.
- Taniguchi 1996 Taniguchi K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T. et al.: A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* 1996: 56(18): 4124-4129.
- Tew 1994 Tew K.D.: Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 1994: 54(16): 4313-4320.
- Tewey 1984 Tewey, K.M., Chen, G.L. et al.: Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA Topoisomerase II. *J. Biol.*

Chem. 1984: 259: 9182-9187.

- Thomas 1996 Thomas, A., El Rouby, S. et al.: Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 1996: 12: 1055-1062
- Tsai 1993 Tsai, C.M., Chang, K.T. et al.: Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines with Her-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1993: 85: 897-901.
- Ueda 1986 Ueda, K., Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., Pastan, I., Roninson, I.B. et al.: The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986: 141(3): 956-962.
- Van der Bliek 1988 Van der Bliek, A.M., Baas, F., Van der Velde-Koerts, T.: Genes amplified and overexpressed in human multidrug resistant cell lines. *Cancer Res.* 1988: 48: 5927-5932.
- Van der Bliek 1989 Van der Bliek, A.M., Borst, P.: Multi-drug resistance. *Adv. Cancer Res.* 1989: 52: 165-203.
- Velculescu 1996 Velculescu, V.E., El-Deiry, W.S.: Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin. Chem.* 1996: 42: 858-868.
- Vellucci 1995 Vellucci, V.F., Germino, F.J., Reiss, M.: Cloning of putative growth regulatory genes from primary human keratinocytes by subtractive hybridization. *Gene* 1995: 166(2): 213-220.
- Waldman 1996 Waldman, T., Lengauer, C. et al.: Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996: 381: 713-716.
- White 1975 White, J.C., Lofffield, S., Goldman, I.D.: The mechanism of action of methotrexate. III: Requirement of free intracellular methotrexate for maximal suppression of [¹⁴C] formate incorporation into nucleic acids and proteins. *Molec. Pharma.* 1975: 11: 287-297.
- Wirth 1992 Wirth, P.J., Luo, L.D., Fujimoto, Y., Bisgaard, H.C.: Two-dimensional electrophoretic analysis of transformation-sensitive polypeptides during chemically, spontaneously, and oncogene-induced transformation of rat liver epithelial cells. *Electrophoresis* 1992: 13(5): 305-320.
- Wolf 1986 Wolf, C.R., Macpherson, J.S., Smyth, J.F.: Evidence for the metabolism of mitozantrone by microsomal glutathione transferases and 3-methylcholanthrene-inducible glucuronosyl transferases. *Biochem-Pharmacol.* 1986: 35(9): 1577-1581
- Yahara 1996 Yahara, I., Aizawa, H. et al.: A role of cofilin/destrin in reorganization of actin cytoskeleton in response to stresses and cell stimuli. *Cell. Struct. Funct.* 1996: 21(5): 421-424.
- Yamada 1997 Yamada, M., Tomida, A. et al.: Overexpression of thioredoxin does not confer resistance to cisplatin in transfected human ovarian and colon cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997: 40(1): 31-37.
- Yarosh 1983 Yarosh, D., Foote, R., Mitra, S.: Repair of D6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in MER minus human tumour cell strains. *Carcinogenesis* 1983: 4: 199-205.
- Zaman 1994 Zaman, G.J., Flens, M.J., van-Leusden, M.R. et al.: The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994: 91(19): 8822-8826.
- Zeng 1994 Zeng, Y. et al.: Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J. Biol. Chem.* 1994: 269: 18727-18730.
- Zhu 1994 Zhu, Q., Center, M.S.: Cloning and sequence analysis of the promoter region of

the MRP gene of HL60 cell isolated for resistance to adriamycin. Cancer Res. 1994; 54: 4488-4492.

Lebenslauf

Name	Gero Hütter
Geburtsdatum	18.12.1968
Geburtsort	Köln
Eltern	Dipl. Volksw. Roland Hütter (geb. 6.6.1930) Marianne Hütter, geb. Kisselbach (geb. 19.1.1932)
Geschwister	Dipl. Ing. Ingo Hütter (geb. 8.4.1964)
Schule	1974-1979 Grundschule 1979-1989 Kaiserin-Auguste-Victoria-Gymnasium in Celle am 10.5.89 mit dem Abitur abgeschlossen
Dienst	24.7.89-30.9.90 Zivildienst 9.9.91-9.3.92 Freiwilliges soziales Jahr
Studium	SoSe '92 Humanmedizin WS '92 Ur- und Frühgeschichte 7.9.1994 Ärztliche Vorprüfung 19.9.1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 16.9.1997 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 20.10.1998 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Beruf	1.10.1996 bis 30.9.1998 Studentische Hilfskraft für das Praktikum der Klinische Chemie und Biochemie, Charité Campus Virchow Seit 1.4.1999 Arzt im Praktikum Hämatologie/Onkologie UKBF Berlin

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Gero Hütter geb. 18.12.1968 in Köln, an Eides Statt, daß die Dissertation mit dem Titel: „**Chemoresistenzassoziierte Veränderungen der Proteinexpression bei Kolon-, Mamma-, Magen-, Pankreaskarzinom und Fibrosarkom mit Hilfe der hochauflösenden zweidimensionalen Elektrophorese im immobilisierten pH-Gradienten**“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Gero Hütter

Berlin, 1. Februar 1999